

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE
DE NANTES

Année 1966-1967

N° 6

Première Thèse:

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'ACTION PROTECTRICE
D'UN EXTRAIT AQUEUX TOTAL DE VESICULE BILIAIRE
DE MOUTON CONTRE L'EFFET CANCEROGENE
DU BENZO 3,4-PYRENE

Deuxième Thèse

Propositions données par la Faculté

THESE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'ETAT EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement

le 16 juin 1967

par

Claude MOUSSION

né le 30 juin 1937 à Longeville (Vendée)

Pharmacien

Diplôme du C.E.S. d'Hématologie

Licencie ès-Sciences

Assistant à la Faculté

Membres du Jury: Monsieur le Professeur MONNET, Président
Monsieur le Professeur PLOQUIN, Juge
Monsieur le Professeur TUSQUES, Juge
Monsieur BOITEAU H.
Maitre de Conférences Agrégé, Juge

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE
DE NANTES

Année 1966-1967

N° 6

Première Thèse:

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'ACTION PROTECTRICE
D'UN EXTRAIT AQUEUX TOTAL DE VESICULE BILIAIRE
DE MOUTON CONTRE L'EFFET CANCEROGENE
DU BENZO 3,4-PYRENE

Deuxième Thèse

Propositions données par la Faculté

THESE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'ETAT EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement

le 16 juin 1967

par

Claude MOUSSION

né le 30 juin 1937 à Longeville (Vendée)

Pharmacien

Diplôme du C.E.S. d'Hématologie

Licencié ès-Sciences

Assistant à la Faculté

Membres du Jury: Monsieur le Professeur MONNET, Président
Monsieur le Professeur PLOQUIN, Juge
Monsieur le Professeur TUSQUES, Juge
Monsieur BOITEAU H.
Maître de Conférences Agrégé, Juge

FACULTE MIXTE DE MEDECINE

ET DE

PHARMACIE DE NANTES

Doyen Honoraire de la Faculté M. AUVIGNE

Professeurs Honoraires de l'Ecole de Plein Exercice, de l'Ecole Nationale et de la Faculté :

MM. DALLONGEVILLE, GUERITHAULT, GUEGUEN, LEROUX, PERRIN, PICARD.

Doyen : M. Y. BOQUIEN

Assesseurs : M. R. MONNET
M. J. P. KERNEIS

Professeurs Titulaires de Chaires

MM.

BARON F.	Clinique O. R. L.
BOQUIEN Y.	Clinique Médicale B
BUREAU R.	Clinique Chirurgicale Infantile et Orthopédique
BUREAU Y.	Clinique Dermatologique
DELAIRE J.	Clinique Stomatologique
DESCUNS P.	Clinique Neuro-chirurgicale
FOUCAUD A.	Botanique et Cryptogamie
GIROIRE H.	Clinique Neurologique
GRISLAIN J.	Clinique Médicale Infantile
GUIHARD R.	Physique
GUILLON J.	Pathologie Médicale
HOREAU J.	Clinique Médicale A
HOULNE P.	Obstétrique et Gynécologie
KERNEIS J. P.	Anatomie Pathologique
LEGRAND J.	Clinique Ophtalmologique
LOSSOUARN E. P.	Chimie Pharmaceutique
MALVY P.	Pathologie Chirurgicale
MONNET R.	Matière Médicale et Pharmacologie
MOUSSEAU M.	Clinique Chirurgicale
NEDELEC M.	Clinique Urologique
PLOQUIN J.	Pharmacie Chimique
ROUZET M.	Pharmacie Galénique
STEPHAN Y.	Pharmacodynamie et Chimie Biol. Pharmaceutique
TUSQUES J.	Histologie et Embryologie
VERAN P.	Thérapeutique
VERMEIL C.	Parasitologie et Pathologie Exotique
VIOLETTE F.	Physiologie

Professeurs titulaires à titre personnel

MM.

CORNET E.	Chirurgie Thoracique et Cardio-vasculaire
DUMORTIER L.	Médecine Légale et Médecine du Travail
GILLOT F.	Pédiatrie
MINICONI P.	Médecine Générale
Mme MUSSINI-MONTEPELLIER J.	Anatomie Pathologique

Professeurs sans Chaire

MM.

BARBIN J. Y.	Anatomie
GUIHARD D.	Physique
HERVOUET F.	Ophthalmologie
PICHAT E.	Anatomie
SOURDILLE J.	Chirurgie générale

Professeur Associé

M. DILFNGF D. Neuro-radiologie

Maîtres de Conférences Agrégés & Agrégés

MM.

AUVIGNY J.	Urologie
BARRIÈRE H.	Dermatologie et Syphiligraphie
BERNARD S.	Biochimie Médicale
BOITEAU H.	Toxicologie
CATTAN A.	Cancérologie
CHARBONNEL A.	Neurologie
COLLET M.	Neurochirurgie
CORROLER J.	Pneumophtisiologie
COTTIN S.	Thérapeutique
COURTIFU A.	Bactériologie - Parasitologie - Virologie
DUPON H.	Chirurgie Thoracique et Cardio-vasculaire
GAILLARD A.	Stomatologie
GALLE P.	Physique
GINET J. D.	Physiologie et Explorations fonctionnelles
GOUIN J. L.	Orthopédie
GUENEL J.	Médecine Générale
HERVOUET D.	Médecine Générale et Thérapeutique
HERZOG B.	Electroradiologie
LERAT M.	Obstétrique
MAINARD R.	Pédiatrie
MOIGNETFAU C.	Pneumophtisiologie
Mme NICOLAS F.	Anesthésiologie
NICOLAS G.	Médecine Légale
OUDEA P.	Médecine Générale et Thérapeutique
Mme de ROECK Y.	Pharmacie Galénique
ROUSSEAU C. (f. f.)	Sciences Naturelles
SENFELAR R.	Histologie
SILVESTRE de FERRON	Chirurgie Générale
WELIN L.	Pharmacodynamie

Secrétaire de la Faculté : M. BOULESTEX E.

Conservateur de la Bibliothèque Universitaire : Mme GALKOWSKI

A mes parents,

en témoignage de mon affection
et de ma reconnaissance

A ma femme,

dont la haute compréhension et
les sacrifices nous ont permis
de poursuivre ce travail

A mes enfants,

avec toute mon affection

A ma famille

A mes amis.

A Monsieur le Professeur J. PLOQUIN

Professeur de Pharmacie Chimique
à la Faculté Mixte de Médecine et de
Pharmacie de NANTES

qui a bien voulu nous faire l'honneur
de juger notre thèse.

Nous le prions de trouver ici l'expres-
sion de nos remerciements et de
notre attachement respectueux et
dévoué.

A Monsieur H. BOITEAU

Maître de Conférences Agrégé
à la Faculté Mixte de Médecine
et de Pharmacie de NANTES

qui a bien voulu nous faire l'honneur
de juger notre thèse.

Nous avons toujours été profondément
touché par l'amabilité constante qu'il
nous a témoignée au cours de cinq
années passées dans son laboratoire
et par les conseils éclairés qu'il nous
a prodigués tout au long de ce travail.

Nous le prions de bien vouloir accepter
l'expression de notre vive gratitude et
de notre profonde reconnaissance.

A Monsieur A. FOUCAUD

Professeur de Botanique et Cryptogamie
à la Faculté Mixte de Médecine et de
Pharmacie de NANTES

Nous tenons à le remercier ici des
précieux conseils qu'il nous a prodigués
pour la rédaction de notre deuxième
thèse.

A Monsieur R. SENELAR

Maître de Conférences Agrégé
à la Faculté Mixte de Médecine
et de Pharmacie de NANTES

qui nous a inspiré le sujet de notre
thèse et a guidé nos travaux avec
une bienveillance constante.

Nous lui exprimons nos sentiments
de vive reconnaissance.

A Monsieur J. PIERI

Professeur de Biologie Moléculaire et Biochimie
à la Faculté des Sciences de NANTES

nous lui exprimons nos vifs remerciements pour l'aide qu'il a bien voulu nous apporter dans la réalisation de ce travail.

A mes camarades d'études, Madame M. Th. MORE,
Mademoiselle M. F. GUILLON et Monsieur P. MORE

pour la collaboration amicale qu'ils nous
ont apportée. En témoignage de notre
profonde amitié.

A Mesdemoiselles C. BORE et C. BOUSSICAULT

dont la collaboration technique nous a été
une aide précieuse. Avec tous nos remer-
ciements.

Notre travail comporte une expérimentation biologique importante qui a pu être réalisée grâce à l'aide matérielle de la Société des Usines Chimiques RHONE-POULENC. Nous lui adressons nos plus vifs et sincères remerciements.

AVANT - PROPOS

La vésicule biliaire a suscité de nombreux travaux de la part des physiologistes et des histologistes, mais il ne semble pas qu'elle ait attiré l'attention des biochimistes : en effet, si on connaît bien sa structure histologique et les phénomènes qui régissent sa contraction, on ignore pratiquement tout de sa composition. Les rares indications que l'on possède à ce sujet découlent des recherches effectuées par comparaison entre la composition de la bile hépatique et celle de la bile vésiculaire.

Les connaissances actuelles sur son rôle biologique sont également assez restreintes ; on ne lui attribue généralement qu'une fonction, et encore modeste, dans la digestion. Mais peut-être l'importance de cet organe a-t-elle été sous-estimée. Des travaux récents, en particulier ceux de TUSQUES et SENELAR, ont montré que la vésicule biliaire est le siège d'une intense activité métabolique.

La confrontation d'une part, des observations de GRAFFI relatives à l'accumulation de benzo 3,4-pyrène dans la vésicule après ingestion de cet hydrocarbure, et d'autre part, des travaux de TUSQUES et SENELAR, nous a incité à rechercher les interactions qui peuvent exister entre la vésicule biliaire et les phénomènes de cancérisation provoqués par cet hydrocarbure en étudiant l'action protectrice d'un extrait de vésicule biliaire de mouton contre la cancérisation induite par le benzo 3,4-pyrène.

PREMIERE PARTIE

RAPPEL DES CONNAISSANCES SUR LES FONCTIONS DE LA VESICULE BILIAIRE

Pendant longtemps, la vésicule biliaire a été considérée comme un simple réservoir dans lequel la bile s'accumule en dehors des périodes digestives. Mais, aujourd'hui, on attribue à cet organe un rôle biologique mieux défini qui comporte une fonction d'absorption et une fonction de sécrétion.

Ces deux fonctions apparaissent déjà quand on compare la composition de la bile hépatique à celle de la bile vésiculaire. Dans le tableau n° 1 nous indiquons les rapports des concentrations que nous avons calculés à partir des chiffres obtenus par POLONOWSKY et BOURILLON (86) pour les composants d'un échantillon de bile hépatique et d'un échantillon de bile vésiculaire.

ELEMENTS	CONCENTRATIONS en g/l		RAPPORT DES CONCENTRATIONS
	Bile hépatique	Bile vésiculaire	$\frac{\text{Bile vésiculaire}}{\text{Bile hépatique}}$
Fau	969	820	
Résidu sec	31	180	5,8
N. Total	0,74	4,9	6,6
P. Total	0,17	1,4	8,2
Choline totale	0,66	5,5	8,3
Sels biliaires	12	115	9,6
Acides gras totaux	3	24	8,0
Lécithines	4,3	35	8,1
Cholestérol	1,1	4,3	3,9
Protéines	1,9	4,5	2,3
Glucides totaux	0,60	2,4	4,0
Glucides réducteurs	0,20	0,8	4,0
Bilirubine	0,35	1,4	4,0

TABLEAU n° 1

L'examen du tableau n° 1 fait ressortir que tous les constituants de la bile subissent une concentration dans la vésicule biliaire, mais en proportions variables : ainsi le rapport des concentrations est égal à 5,8 pour le résidu sec ; il atteint 9,6 pour les sels biliaires et tombe à 2,3 pour les protéines. Il est impossible d'attribuer de telles variations uniquement à une résorption de l'eau. Elles peuvent s'expliquer par l'intervention de deux phénomènes susceptibles de se produire au niveau de l'épithélium vésiculaire : cet épithélium peut soit absorber d'une manière préférentielle certains constituants de la bile hépatique, soit sécréter des substances qui sont déversées dans la bile vésiculaire.

I - FONCTION d'ABSORPTION

Cette fonction fut découverte la première. Depuis les travaux de HEISTER, en 1728, on sait que la bile vésiculaire est plus concentrée que la bile hépatique. Cette différence de concentration démontre qu'une fraction de l'eau contenue dans la bile est résorbée par la paroi vésiculaire. L'importance de cette fraction est assez mal définie et les auteurs ne sont pas d'accord sur le pouvoir de concentration de la vésicule : trois d'après ASCHOFF, huit d'après HAMMARSTEN et plus de dix pour ROUS et Mac MASTER (81). En fait, de telles variations ne sont pas surprenantes, si l'on considère que les examens ont porté sur des échantillons de bile prélevés au cours d'interventions chirurgicales dans des vésicules présentant des lésions inflammatoires ou occlusives. Il n'est pas douteux, en effet, que l'état anatomique de la vésicule influe sur la perméabilité de la membrane des cellules épithéliales. (JOHNSTON) (82).

L'eau n'est pas le seul constituant de la bile à être absorbé par la muqueuse vésiculaire. Les sels minéraux, les sels biliaires, et certains composés lipidiques pénètrent en partie dans l'épithélium. Ainsi, ASCHOFF et BACKMEISTER (82) ont observé la présence de fines gouttelettes graisseuses dans les cellules de cet épithélium, quelques minutes seulement après avoir introduit une émulsion de graisses de lait dans la lumière de la vésicule. D'autre part, la résorption du cholestérol qui avait été discutée pendant longtemps a été confirmée par les travaux de TUSQUES et SENELAR (110) (112). Ces auteurs ont montré que le cholestérol est absorbé par l'épithélium vésiculaire, où il subit des phénomènes d'estérification conduisant à la formation de cholestérides, qui semblent passer dans le réseau capillaire sanguin irriguant la vésicule.

D'autres composants de la bile seraient également absorbés, notamment les pigments biliaires. Mais ce point est encore trop controversé pour qu'il soit possible d'émettre une opinion sur la réalité du phénomène.

II - FONCTION DE SECRETION

Bien que la fonction de sécrétion de la vésicule biliaire soit admise depuis longtemps, il règne encore bien des incertitudes quant à la nature de ces sécrétions.

La vésicule humaine sécréterait une mucine et celle des animaux une pseudo-mucine, dont la présence a pour effet d'augmenter la viscosité de la bile et de maintenir son équilibre colloïdal.

Cette sécrétion, relativement faible dans les conditions physiologiques normales, est fortement augmentée en cas de phénomènes pathologiques, tels que lithiasse ou cholécystite (BAUER et HAKKI) (3), les cellules épithéliales se transformant alors en cellules à mucus. Cette transformation est d'ailleurs réversible, car les cellules reprennent leur type primitif lorsque la cause des troubles a disparu.

En 1960, GILES et ses collaborateurs (43) ont trouvé dans la bile vésiculaire humaine un composé glycoprotéique formé principalement de glucosamine, de galactosamine, de galactose, de petites quantités d'autres sucres (glucose, arabinose, fucose et ribose) et probablement d'une fraction protéinique. L'existence d'une telle sécrétion glycoprotéique dans l'épithélium vésiculaire a été confirmée par des travaux histochimiques, notamment ceux de MONTELLA (77), puis ceux de TUSQUES et SENELAR (111), qui ont décelé la présence de mucopolysaccharides neutres ou acides dans la paroi de la vésicule de mouton et de celle de cobaye.

VERSCHURE a également trouvé une glycoprotéine dans la bile vésiculaire de malades atteints d'une affection de la vésicule. Cette glycoprotéine serait toujours absente de la bile prélevée dans une vésicule saine. Il s'agirait donc là d'une sécrétion pathologique.

La paroi de la vésicule biliaire ne semble être pas la seule à

pouvoir sécréter une substance de cette nature. Ainsi, MAXFIELD et WOLINS (72) ont décelé la présence d'une glycoprotéine analogue à celle trouvée par VERSCHURE dans la bile prélevée chez un malade qui avait antérieurement subi une cholécystectomie. Ces auteurs admettent que cette glycoprotéine est sécrétée par l'épithélium des canaux biliaires, mais seulement dans les cas d'irritation ou d'inflammation. Cette interprétation rejoint donc celle formulée par BAUER et HAKKI.

D'autre part, VERSCHURE (114) (115) (116) a mis en évidence dans la bile vésiculaire humaine, un complexe lipoprotéique, la "bililipoprotéine", qu'il ne retrouve pas dans la bile hépatique, sauf dans certaines circonstances pathologiques et seulement en très petite quantité. Dans cette combinaison, des pigments et des sels biliaires sont liés à une lipoprotéine. Cette structure complexe a pu être démontrée grâce à l'ultracentrifugation et à l'électrophorèse combinée à des réactions de coloration spécifique.

Des travaux récents ont mis en doute l'existence de la "bililipoprotéine" de VERSCHURE et de la glycoprotéine trouvée par MAXFIELD et WOLINS dans la bile. RUSSEL et BURNETT (94), après avoir injecté à des lapins de la bile humaine, ne retrouvent pas, par des méthodes d'immunodiffusion et d'immunoélectrophorèse, les anticorps correspondant à ces deux composés. Ils en déduisent qu'ils ne sont pas de nature protéique. Toutefois, on peut objecter à cette interprétation des résultats que la "bililipoprotéine" de VERSCHURE et le complexe glycoprotéique de MAXFIELD et WOLINS ne sont pas nécessairement antigéniques vis-à-vis du lapin.

Bien qu'ils soient fragmentaires et parfois contradictoires, les travaux concernant la fonction de sécrétion de la vésicule biliaire démontrent cependant un fait important et indiscutable : l'existence d'une fonction exosécrétoire de l'épithélium vésiculaire.

III - ACTIVITE METABOLIQUE

Le fait que l'épithélium vésiculaire sécrète des glycoprotéines qui passent dans la bile implique qu'il soit le siège d'un métabolisme protidique. TUSQUES et SENELAR (109) ont confirmé l'existence d'un tel métabolisme et ont pu en préciser certains aspects.

En examinant à l'aide de techniques histochimiques des coupes de vésicule, ces auteurs ont décelé deux types de cellules sécrétices : des cellules mucosécrétantes, en petit nombre, à l'intérieur desquelles ils ont pu suivre l'élaboration de mucopolysaccharides acides, qui sont finalement déversés dans la bile vésiculaire, et des cellules sécrétices d'un autre type, particulièrement nombreuses dans la vésicule de cobaye, qui élaborent des mucopolysaccharides neutres. Ces derniers ne sont pas éliminés dans la bile, mais passent dans les capillaires sanguins qui tapissent la membrane basale de l'épithélium. TUSQUES et SENELAR voient dans ce phénomène la preuve de l'existence d'une véritable fonction endocrine de la vésicule. Ces auteurs ont, en outre, observé que les cellules épithéliales de la vésicule biliaire sont le siège d'une pinocytose caractéristique du catabolisme protidique. Une invagination de la membrane enserme une portion du contenu vésiculaire et forme une vacuole qui migre vers l'intérieur de la cellule. Au cours de sa migration, la vacuole se charge d'hydrolases et se transforme en phagosome. Sous l'action des enzymes hydrolysantes, le contenu vacuolaire est lysé et les polypeptides formés diffusent dans le cytoplasme avoisinant.

A côté de ce processus catabolique, il semble exister des arguments en faveur d'un anabolisme protidique : TUSQUES et SENELAR ont en effet observé à l'intérieur des cellules de l'épithélium la présence de sacs ergastoplasmiques fortement dilatés et remplis d'un matériel abondant,

ainsi qu'un intense transfert d'A.R.N. nucléolaire vers les régions cytoplasmiques.

L'activité métabolique dont témoigne l'épithélium vésiculaire va de pair avec sa richesse en enzymes rapportée par BERNARD et ses collaborateurs (8) ; ainsi l'activité pyruvate-kinase est trois fois supérieure à celle du tissu hépatique. Ces auteurs ont également constaté que cet épithélium est le siège d'une glycolyse intense, alors qu'apparemment il ne consomme pas d'oxygène et ne produit pas d'A.T.P. ; ils voient dans la prédominance de l'activité glycolytique sur le métabolisme aérobie une preuve en faveur d'une activité sécrétice de l'épithélium vésiculaire.

L'ancienne notion de la vésicule biliaire, simple sac de dialyse, est donc aujourd'hui périmée. Le rôle de la vésicule paraît beaucoup plus complexe et aussi beaucoup plus important. Son activité sécrétrice ne peut plus être mise en doute, même si la nature exacte des produits de sécrétion reste imprécise et si leur rôle biologique n'apparaît pas d'une manière évidente. En outre, l'élaboration de produits de sécrétion au sein de l'épithélium vésiculaire est en rapport étroit avec l'existence d'une activité métabolique intense qui intéresse surtout les composés protidiques.

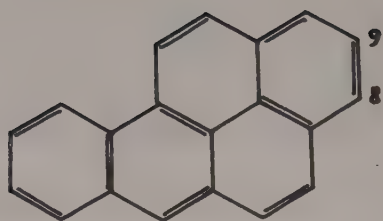
L'évolution des connaissances sur le rôle de la vésicule biliaire tend donc à donner raison à ceux qui défendent l'importance biologique de cet organe, en s'appuyant sur des arguments d'ordre embryologique, tératologique ou physiopathologique. Le développement de la vésicule biliaire chez les larves de grenouille commence avant celui de la vessie et, chez l'Homme, l'ébauche cystique, origine de la vésicule, est très précoce. Or, on admet, du point de vue embryologique, que l'importance d'un organe, se mesure à la précocité de son développement. De plus, la persistance de la vésicule dans l'espèce humaine est un argument phylogénétique qui a aussi sa valeur et, enfin, on a remarqué qu'après cholécystectomie, la vésicule se reproduit presque toujours fonctionnellement de façon assez complète et quelquefois même anatomiquement de façon rudimentaire, à partir des canaux biliaires ou cystique (82).

DEUXIEME PARTIE

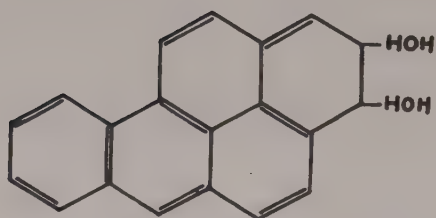
MISE EN EVIDENCE D'UNE ACTION PROTECTRICE D'UN EXTRAIT AQUEUX TOTAL DE VESICULE BILIAIRE DE MOUTON CONTRE L'ACTION CANCEROGENE DU BENZO 3,4-PYRENE

I - GENERALITES

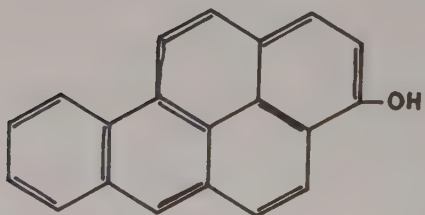
Alors que nous étudions le métabolisme du benzo 3,4-pyrène, notre attention fut attirée par une observation de GRAFFI et de ses collaborateurs (49) (51) : trois heures après avoir administré du benzo 3,4-pyrène, par voie orale, à des souris, ces auteurs ont observé que l'épithélium vésiculaire, examiné au microscope, présente une intense fluorescence, alors que le tissu conjonctif et la tunique musculieuse sous-jacente ne sont qu'à peine fluorescents. La fluorescence observée provient de l'accumulation au niveau de l'épithélium vésiculaire du benzo 3,4-pyrène ou de ses métabolites élaborés par le foie, produits d'oxydation en positions 8 et 9, notamment le dihydroxydihydro 8,9-benzo 3,4-pyrène et ses esters (16) (121) (122). Ces métabolites doués d'un pouvoir cancérigène (25) sont ensuite éliminés par la bile. GRAFFI a, en outre, constaté que les composés polycycliques n'imprègnent pas le noyau des cellules de l'épithélium, mais se répartissent dans les organelles du cytoplasme (mitochondries, ergastoplasme, corps de Golgi), donc dans les structures qui sont le siège des activités métaboliques.



benzo 3,4-pyrène



dihydroxydihydro 8,9-benzo 3,4-pyrène



hydroxy 8-benzo 3,4-pyrène

GRAFFI et ses collaborateurs n'émettent pas d'hypothèse sur la signification biologique de l'accumulation du benzo 3,4-pyrène et de ses dérivés à l'intérieur de la paroi de la vésicule.

Toutefois, connaissant l'activité métabolique de l'épithélium vésiculaire, il est permis de supposer que les composés polycycliques subissent dans cet organe des transformations qui aboutissent à leur inactivation. En effet, bien que le benzo 3,4-pyrène et ses métabolites se concentrent dans la vésicule, on n'a jamais observé d'induction de cancer par ce produit au niveau de cet organe (47). Il serait étonnant que des dérivés doués d'un pouvoir cancérigène intense puissent séjourner dans l'épithélium vésiculaire sans provoquer de phénomène de cancérisation s'ils ne subissaient pas de biotransformations qui diminuent leur activité biologique.

Par ailleurs, cette inactivation éventuelle pourrait être rapprochée d'un fait biologique connu depuis longtemps : la résistance spontanée du cobaye à la cancérisation par les hydrocarbures polycycliques. Or, des études histologiques et histochimiques ont montré que le cobaye possède une vésicule biliaire relativement beaucoup plus développée que les autres animaux, que sa structure est plus complexe et qu'elle est le siège d'une intense activité métabolique (111).

Désirant vérifier l'inactivation éventuelle du benzo 3,4-pyrène ou de ses métabolites cancérigènes dans l'épithélium vésiculaire, nous avons envisagé plusieurs modes d'expérimentation :

- comparer la composition qualitative et quantitative de la bile hépatique et de la bile vésiculaire du point de vue des dérivés du benzo 3,4-pyrène (notamment du dihydroxydihydro 8,9-benzo 3,4-pyrène et de ses esters, et de l'hydroxy 8-benzo 3,4-pyrène, faiblement cancérigène et considéré comme une forme d'élimination du benzo 3,4-pyrène) ; mais, chez les petits animaux de laboratoire, il est pratiquement impossible de

recueillir des quantités de bile suffisantes pour pouvoir procéder à des analyses précises ;

- différencier les métabolites du benzo 3,4-pyrène sur des coupes histologiques au moyen de leur absorption dans l'ultraviolet, ce qui suppose une pratique histochimique particulière ;

- administrer à des animaux traités par le benzo 3,4-pyrène les constituants naturels de l'épithélium vésiculaire qui sont susceptibles d'activer le métabolisme et d'accélérer la détoxication de ce cancérogène; cette recherche pouvait être menée à bien sans trop de difficultés en étudiant la protection que peut apporter un extrait aqueux total de vésicule biliaire contre la cancérisation induite par le benzo 3,4-pyrène chez de petits animaux de laboratoire.

II - METHODE D'EXPERIMENTATION

1 - PREPARATION D'UN EXTRAIT AQUEUX TOTAL DE VESICULE BILIAIRE :

A) Choix de l'espèce animale :

L'animal de choix pour la préparation d'un extrait aurait été le cobaye étant donné sa résistance naturelle à la cancérisation par le benzo 3,4-pyrène ; mais compte tenu de la petite taille de la vésicule de cet animal, il eut été impossible de préparer une quantité suffisante d'extrait, à moins de sacrifier un nombre considérable d'animaux.

Notre choix s'est porté sur un animal de plus grande taille, le mouton, dont la vésicule présente, du point de vue histologique, certaines analogies avec celle du cobaye. Le mouton est en outre un animal de boucherie, dont il est facile de se procurer les vésicules biliaires.

B) Prélèvement et préparation des vésicules :

Les vésicules sont prélevées aussitôt après l'abattage des animaux ; elles sont incisées, vidées de leur bile, lavées rapidement à l'eau distillée, puis essorées sur papier Joseph. Elles sont débarrassées de toutes les parcelles de foie qui ont pu être entraînées lors du prélèvement.

C) Obtention de l'extrait :

Les vésicules sont broyées dans de l'eau fraîchement distillée à l'aide d'un appareil Ultra-Turrax. La quantité d'eau distillée utilisée est telle qu'un ml de broyat correspond à 0,5 g de vésicule fraîche.

L'homogénat, centrifugé à + 4°C, se répartit en trois couches :

- une couche surnageante pâteuse contenant principalement des graisses ;
- un culot formé par des débris cellulaires ;
- une couche intermédiaire liquide.

Après décantation, la phase liquide est récupérée et filtrée sous vide, à travers une membrane "Sartorius" en cellulose et acétate de cellulose (diamètre moyen des pores 200 m μ).

Pour obtenir un extrait de composition relativement constante, le filtrat est dilué de manière à fournir 20 mg/ml de résidu sec à 105° C.

L'extrait est ensuite rendu isotonique par addition d'une quantité de chlorure de sodium calculée en fonction du point d'abaissement cryoscopique. Afin d'assurer sa parfaite conservation, il est additionné de mercurothiolate de sodium, à la concentration de 1/20000. Enfin, il est stérilisé par filtration bactériologique et mis en ampoules stériles.

2 - PROTOCOLE D'EXPERIMENTATION SUR LA SOURIS :

A) Détermination de la toxicité de l'extrait :

L'extrait ainsi préparé est un extrait total d'organe renfermant certainement des substances protéiques. Il était donc légitime de craindre que son injection répétée chez la souris provoque des phénomènes de sensibilisation capables d'entraîner la mort de l'animal. Pour cette raison, nous avons jugé indispensable de déterminer la toxicité de l'extrait que nous avons préparé, avant d'entreprendre une expérimentation qui devait porter sur un nombre élevé d'animaux.

Nous opérons sur des lots de 10 souris. L'extrait est injecté par voie sous-cutanée, trois fois par semaine, pendant un mois, à raison de 0,1, 0,2 ou 0,3 ml par animal, suivant le lot (lot n° 1, lot n° 2 et lot n° 3).

Nous avons limité le volume des injections à 0,3 ml. Cette dose qui correspond à 12 ml/kg nous a paru suffisante pour l'expérimentation que nous désirions entreprendre.

A l'issue de ces séries d'injections, tous les animaux ont survécu et aucun n'a présenté de troubles locaux ou généraux pouvant être en rapport avec une action toxique ou sensibilisante.

Après avoir sacrifié ces animaux, nous avons demandé au Laboratoire d'Histologie de procéder aux examens anatomopathologiques de divers organes ; aucune lésion n'a été décelée dans le foie, les reins, les surrénales, la rate ou les poumons (99).

L'extrait n'est donc pratiquement pas toxique. L'absence d'action sensibilisante, assez surprenante de la part d'un extrait total d'organe non purifié, doit être rapprochée des résultats obtenus par RUSSEL et BURNETT (94) qui sont en faveur d'une absence de pouvoir antigénique de la part des produits que sécrète l'épithélium de la vésicule biliaire (bililipoprotéine de VERSCHURE et glycoprotéine de MAXFIELD et WOLINS).

B) Etude du pouvoir protecteur contre l'action cancérogène du benzo 3,4-pyrène :

Un lot de 100 souris albinos de race Swiss, des deux sexes, provenant du même élevage, de même âge, recevant la même nourriture et d'un poids voisin de 22 g est divisé en deux groupes :

- le groupe A, utilisé comme témoin, dont les animaux reçoivent des applications de benzo 3,4-pyrène
- le groupe B, dans lequel les animaux reçoivent, en plus des applications de benzo 3,4-pyrène, des injections d'extrait aqueux total de vésicule biliaire.

Le benzo 3,4-pyrène est appliqué dans les conditions suivantes : une goutte d'une solution acétonique de cet hydrocarbure à 500 mg pour 100 ml est déposée sur la région dorsale, à la base du cou. Les applications ont lieu deux fois par semaine, pendant 90 jours.

Les souris du lot B reçoivent, en outre, trois injections par semaine d'extrait vésiculaire, à raison de 0,3 ml par voie sous-cutanée. Les injections ne sont pas arrêtées en même temps que les applications de benzo 3,4-pyrène ; elles sont poursuivies au même rythme jusqu'à la mort de l'animal.

III - R E S U L T A T S

Nous avons enregistré un fort pourcentage de décès dans les deux lots de souris en expérience ; à la fin des applications de benzo 3,4-pyrène, il reste seulement 30 souris dans chaque lot.

Cette mortalité élevée doit être imputée à l'emploi d'une solution très concentrée de benzo 3,4-pyrène, car, ainsi que le souligne GRAFFI (48), les solutions de ce produit se montrent toxiques pour la souris dès que leur concentration dépasse 0,1 p. 100.

Lorsque les applications de benzo 3,4-pyrène sont terminées, le rythme des décès se ralentit, sans pour autant devenir négligeable, la mort des souris pouvant alors être attribuée à diverses causes : intoxication, suites de la cancérisation ou encore mort spontanée, étant donnée la durée de l'expérimentation qui atteint une année.

Vers la fin du troisième mois, les phénomènes de cancérisation commencent à se manifester sous la forme de papillomes cutanés évoluant vers des épithéliomas spinocellulaires. Notre expérimentation a consisté à comparer le nombre d'animaux cancérisés dans chacun des deux lots de souris.

Pour exprimer nos résultats, nous avons dû tenir compte du fait que l'effectif de chaque lot diminue continuellement par suite de la mort des souris, qu'elles portent ou non des tumeurs cancéreuses. Or, un doute subsiste quant au sort de toute souris qui meurt avant d'être cancé-

risée, car, elle aurait fort bien pu présenter une tumeur à plus ou moins brève échéance, si elle avait survécu.

C'est pourquoi nous avons adopté un mode d'expression qui exclue des groupes d'animaux en expérience les souris mortes sans être porteuses de tumeurs. Nous avons rapporté le nombre de souris cancérisées (n_1) à la somme ($n_1 + n_2$) du nombre des souris cancérisées et de celui des souris non cancérisées vivantes (n_2).

Ce mode d'expression des résultats est sévère, car la mort d'une souris non cancérisée entraîne une augmentation du rapport

$$\frac{n_1}{n_1 + n_2} \times 100$$
 par diminution du dénominateur, et ce rapport atteint inéluctablement la valeur 100, lorsque tous les animaux non cancérisés sont morts, n_2 étant alors égal à 0.

Par ailleurs, afin d'établir s'il existe une différence significative entre la fréquence des tumeurs dans le groupe des souris traitées (groupe B) et dans celui des souris témoins (groupe A), nous avons utilisé le test du χ^2 corrigé de YATES, le paramètre χ^2 étant calculé en fonction des résultats enregistrés à la fin de chaque période de trente jours.

Les résultats représentés sur le graphique n° 1 et dans les tableaux n° 2, n° 3 et n° 4 indiquent que l'injection d'extrait aqueux total de vésicule biliaire retarde le processus de la cancérisation cutanée induite par le benzo 3,4-pyrène chez la souris. Le test du χ^2 montre que ce retard est significatif pendant les sept mois qui suivent le début de l'expérience.

LOT TEMOIN

Temps écoulé -Jours-	Nombre de souris cancérisées n 1	Nombre de souris non cancérisées vivantes n 2	Total n 1 + n 2	Pourcentage de souris cancérisées $\frac{n 1}{n 1 + n 2} \times 100$
90	8	22	30	26,6
120	21	8	29	72,4
150	21	8	29	72,4
180	26	3	29	89,6
210	26	3	29	89,6
240	26	3	29	89,6
270	26	3	29	89,6
300	26	3	29	89,6
330	28	1	29	96,0
360	28	0	28	100
390	28	0	28	100
420	28	0	28	100

TABLEAU n° 2

LOT TRAITE

Temps écoulé	Nombre de souris cancérisées .	Nombre de souris non cancérisées vivantes	Total	Pourcentage de souris cancérisées
-Jours-	n 1	n 2	n 1 + n 2	$\frac{n 1}{n 1 + n 2} \times 100$
90	1	29	30	3,4
120	6	23	29	20,6
150	7	22	29	24,1
180	9	18	27	33,3
210	14	11	24	58,3
240	14	8	22	63,6
270	16	5	21	76,1
300	16	5	21	76,1
330	16	3	19	84,2
360	17	2	19	89,4
390	17	1	18	94,4
420	17	0	17	100

TABLEAU n° 3

Temps écoulé depuis le début des badigeonnages - Jours -	Pourcentage de souris cancérisées		χ^2_c
	Lot témoin	Lot traité	
90	26,6	3,4	4,70
120	72,4	20,6	12,95
150	72,4	24,1	11,66
180	89,6	33,3	16,59
210	89,6	58,3	5,37
240	89,6	63,6	3,58
270	89,6	76,1	0,79
300	89,6	76,1	
330	96,0	84,2	
360	100	89,4	

χ^2_c 0,05 pour un degré de liberté = 3,84

χ^2_c 0,01 pour un degré de liberté = 6,64

χ^2_c 0,001 pour un degré de liberté = 10,83

TABLEAU n° 4

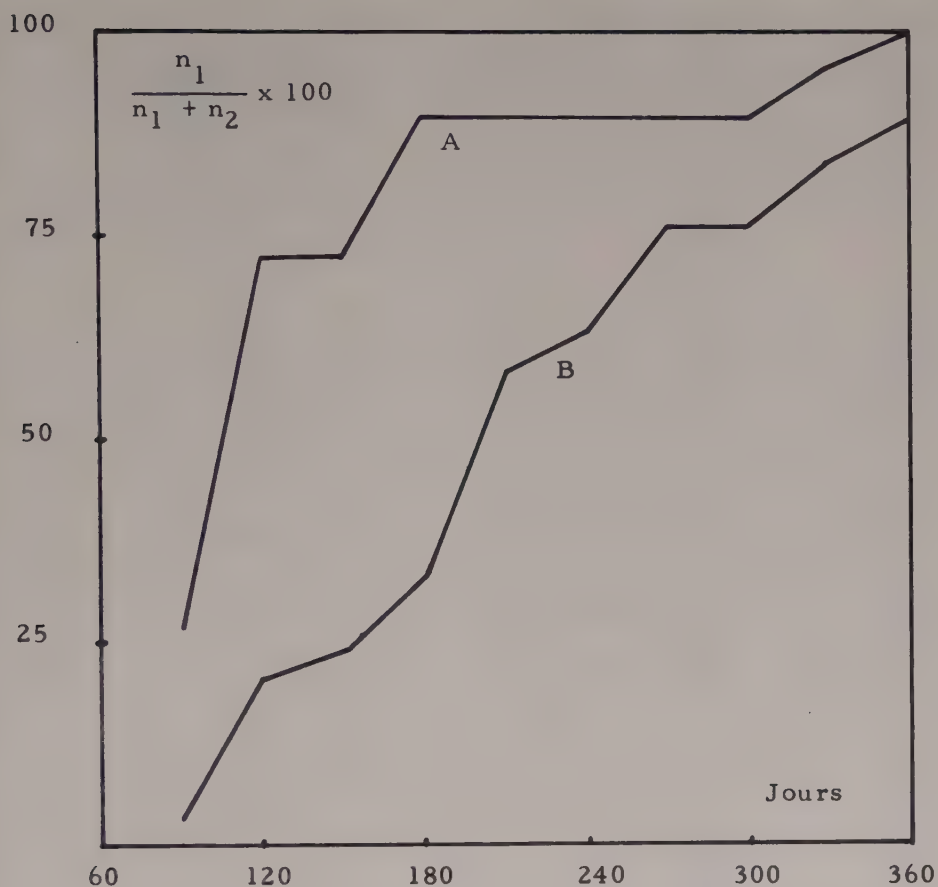


Figure n° 1

A - Pourcentage d'animaux cancérisés dans le lot témoin

B - Pourcentage d'animaux cancérisés dans le lot traité

DUREE DE L'EVOLUTION DE LA TUMEUR - JOURS -	
Lot témoin	Lot traité
59	17
233	145
14	141
103	63
42	76
7	11
63	160
44	87
59	256
59	111
167	31
108	277
64	148
87	144
184	62
40	21
166	178
111	
133	
61	
20	
115	
$\bar{x}$ = 88 jours σ = 59 $\bar{x} \pm 2,58 \sigma_m = 88 \pm 153$	$\bar{x}$ = 113 jours σ = 79 $\bar{x} \pm 2,58 \sigma_m = 113 \pm 204$
t = 1,13 (t = 1,055 pour une probabilité de 70%).	

TABLEAU n° 5

D'autre part, il nous a paru intéressant de rechercher dans le lot des souris traitées, si l'injection d'extrait aqueux total de vésicule biliaire avait une incidence sur la durée de l'évolution des tumeurs déclarées. Dans ce but, nous avons calculé, pour chaque souris, la durée de l'évolution de la tumeur, que nous définissons comme le temps écoulé entre son apparition et la mort de l'animal (Tableau n° 5).

La comparaison statistique, à l'aide du test t, des durées moyennes d'évolution dans le groupe A et dans le groupe B fait ressortir un allongement de la durée de survie des animaux traités qui est significatif avec une probabilité voisine de 75 p. 100. Cette probabilité est trop faible pour qu'il soit possible de conclure que l'injection d'extrait vésiculaire freine l'évolution des tumeurs provoquées par le benzo 3,4-pyrène chez la souris. Cependant, il est à signaler que, pour deux souris du lot B, la durée de l'évolution dépasse d'une manière significative la valeur limite trouvée dans le lot témoin qui est de 241 jours pour une probabilité de 99 p. 100.

TROISIEME PARTIE

ETUDE DE LA COMPOSITION DE L'EXTRAIT AQUEUX TOTAL DE VESICULE BILIAIRE DE MOUTON

L'extrait dont nous avons montré l'action protectrice contre l'effet cancérigène du benzo 3,4-pyrène est un milieu biologique complexe.

Nous avons essayé d'isoler, puis, si possible, d'identifier le constituant responsable de l'activité biologique. Mais avant d'entreprendre un fractionnement de cet extrait, dont nous ignorions la composition, nous avons procédé au dosage des éléments et des composés organiques qui entrent généralement dans la constitution de la matière vivante, afin de déterminer la nature des diverses fractions qu'il faudrait envisager d'isoler.

Toutes les déterminations que nous allons exposer ont été effectuées sur l'extrait brut non ajusté et avant addition de merthiolate et de chlorure de sodium.

I - METHODES D'ANALYSE

1 - CARACTERES GENERAUX :

A) pH :

Le pH est mesuré par la méthode électrométrique.

B) Point cryoscopique :

La détermination est effectuée selon la technique classique, en utilisant un thermomètre gradué en centièmes de degré, dont le zéro est vérifié avant chaque détermination par rapport au point de congélation de l'eau distillée.

C) Résidu sec :

2 ml d'extrait sont évaporés dans une capsule tarée, à l'étuve à + 105°C, jusqu'à poids constant.

D) Cendres :

50 ml d'extrait sont évaporés à l'étuve dans un creuset taré, puis le résidu est calciné au four à moufle, à 450°C environ, jusqu'à obtention de cendres blanches. La destruction des matières organiques est facilitée par addition de quelques millilitres de perhydrol R P à 110 volumes.

2 - ELEMENTS MINERAUX :

A) Chlore :

La technique utilisée est une application de la méthode de VOTOCEK.

2 ml d'extrait sont déféqués par le tungstate de sodium en milieu sulfurique. Après centrifugation, le chlore est dosé dans le liquide surnatant.

geant à l'aide d'une solution titrée de nitrate mercurique, en milieu nitrique, et en présence de diphénylcarbazonne comme indicateur de fin de réaction.

B) Sodium et Potassium :

Ces deux métaux alcalins sont dosés par photométrie de flamme.

Pour le dosage du potassium, l'extrait est dilué au 1/50ème dans une solution de chlorure de sodium à 25 mEq/l et renfermant 1 p. 100 de Stérox pour abaisser la tension superficielle du liquide.

Les déterminations du sodium sont faites sur une dilution de l'extrait à 1 p. 100 dans l'eau distillée.

C) Calcium :

Nous avons appliqué la méthode complexométrique de TRONCHET (107), méthode utilisant comme indicateur l'acide hydroxy 2 (hydroxy 2 sulfo 4 naphtylazo 1) - 1 naphthoïque 3 dilué à 1 pour 100 dans le sulfate de sodium anhydre. (Indicateur de PATTON et REEDER) (80).

Toutefois, la coloration de l'extrait ne permettant pas de saisir avec précision le changement de teinte de l'indicateur, nous procédons à la séparation préalable du calcium par précipitation à l'état d'oxalate.

5 ml d'extrait sont mesurés dans un tube à centrifuger et additionnés d'1 ml d'une solution saturée d'oxalate d'ammonium. Après 12 heures de repos pour permettre une précipitation complète de l'oxalate de calcium, le liquide est centrifugé. Le culot est lavé avec quelques millilitres de la solution d'oxalate d'ammonium, puis dissout à chaud dans 2 ml d'acide chlorhydrique N. Après dilution avec 10 ml d'eau distillée puis addition d'1 ml d'une solution tampon alcaline cyanurée et "d'une pointe de canif" de l'indicateur, le calcium est titré par une solution de complexon III 0,002 M, jusqu'à virage au bleu.

D) Oligo-éléments :

On désigne par ce terme, les éléments métalliques présents dans un milieu biologique à une concentration extrêmement faible.

a) Recherche qualitative :

Avant d'entreprendre le dosage des divers oligo-éléments contenus dans l'extrait, il était nécessaire de procéder à une recherche qualitative pour limiter le champ des déterminations. La méthode utilisée devait présenter une sensibilité **et une spécificité** suffisantes pour déceler tous les métaux contenus dans les cendres de l'extrait, même à l'état de traces.

La spectrographie d'émission est la méthode qui possède au plus haut degré ces deux qualités ; en outre, elle présente l'avantage de permettre la recherche de tous les métaux sur un même échantillon et en une seule opération (83). Son principe est basé sur l'identification des éléments par le spectre de leurs atomes neutres ou ionisés. Pour obtenir le spectre de tous les éléments, il est nécessaire de disposer d'une source d'énergie suffisamment intense. C'est pourquoi on utilise l'arc ou l'étincelle électrique, cette dernière présentant l'avantage d'une plus grande stabilité.

Nous avons adopté le mode opératoire suivant : les cendres provenant de la minéralisation de 100 ml d'extrait sont reprises par quelques millilitres d'acide chlorhydrique N, à chaud ; la solution obtenue est filtrée sur verre fritté de manière à éliminer la silice provenant du creuset, puis évaporée à sec ; le résidu d'évaporation est trituré au porphyre avec du carbone pur pour spectrographie, jusqu'à obtention d'un mélange homogène qui, comprimé dans un moule cylindrique, fournit une "brique".

Cette "brique" est fixée dans l'appareil où elle tient la place d'une électrode pour la production de l'étincelle. Le rayonnement d'émission est dispersé à travers un prisme de quartz et le spectre est enregistré sur plaque sensible entre 2300 et 3800 Å.

Les longueurs d'onde sont repérées par comparaison avec un

spectre de référence (celui du fer) photographie sur la même plaque.

L'examen des plaques photographiques à l'aide d'un comparateur de spectres permet le repérage des raies, en particulier des raies ultimes, caractéristiques des éléments à l'état de traces.

Par cette méthode nous avons décelé dans l'extrait aqueux total de vésicule biliaire la présence de cinq métaux : le manganèse, la magnésium, le fer, le cuivre et le zinc. Nous n'avons pas observé la présence sur le spectre des raies ultimes de divers autres oligo-éléments souvent rencontrés dans les milieux biologiques tels que le cobalt et le nickel.

b) Méthodes de dosage :

Minéralisation de l'extrait.

La méthode de minéralisation par voie humide nous a paru préférable, car elle évite les pertes par volatilisation, notamment celles de zinc et de cuivre, ou par insolubilisation (fer).

Dans un matras de Kjeldahl, on mesure :

- 100 ml d'extrait,
- 2,5 ml d'acide sulfurique pur pour Toxicologie.
- 5 ml d'acide nitrique pur pour Toxicologie.

Le liquide est concentré jusqu'à apparition d'une teinte brune. Nous avons constaté que la concentration en présence d'acide nitrique évite la formation d'une mousse abondante due à la présence des sels biliaires. La minéralisation est poursuivie par addition ménagée d'acide nitrique. Lorsque la minéralisation est terminée, les dérivés nitreux sont détruits par ébullition après addition d'une solution d'urée à 1 p. 100.

Le volume du liquide de minéralisation est ajusté à 25 ml avec de l'eau distillée.

Une minéralisation témoin est conduite parallèlement en utilisant les mêmes quantités de réactifs. Le liquide ainsi obtenu servira à la pré-

paration d'essais à blanc pour les différents dosages. Cette précaution est nécessaire, car des traces de métaux peuvent être apportées par l'acide nitrique qui est employé en quantité relativement importante (fer), ou cédées par le verre du matras (magnésium et zinc).

Magnésium.

L'une des méthodes les plus sensibles et les plus spécifiques du dosage du magnésium est celle qui utilise le 1-azo-2 - hydroxy-3 (2, 4 diméthyl - carboxanilido) naphtalène-1 (2 - hydroxybenzène-4 - sulfonate de sodium) (réactif de MANN et YOE) (71). En opérant suivant la technique proposée par BOHUON (12), nous avons remarqué qu'il n'est pas possible d'obtenir une courbe de référence qui soit régulière. Cette observation nous a incité à reprendre l'étude de la technique de dosage.

En milieu hydroalcoolique, à un pH compris entre 9 et 10, le réactif présente une teinte bleue, qui vire au rose en présence d'ions magnésium.

Nous avons établi les spectres d'absorption du réactif et de son complexe magnésien, en opérant sur la même quantité de réactif additionnée d'un excès d'ions magnésium suffisant ($500 \mu\text{g}$) pour le consommer en totalité, sans pour autant provoquer une floculation comme cela se produit en présence d'une trop grande quantité de magnésium. Ces spectres sont représentés sur la figure n° 2.

Il ressort de leur examen qu'entre 450 et $600 \text{ m}\mu$, le réactif et son complexe magnésien ont tous les deux une absorption notable. Par conséquent, il est nécessaire pour réaliser un dosage précis, d'effectuer une spectrophotométrie à deux longueurs d'onde : au maximum d'absorption du complexe, à $505 \text{ m}\mu$, et au maximum d'absorption du réactif, à $600 \text{ m}\mu$.

Ayant vérifié que la coloration du réactif et celle du complexe suivent la loi de BEER - LAMBERT, pour des densités optiques comprises entre 0 et 0,800, nous sommes autorisés à écrire, d'après la loi d'additivité des densités optiques :

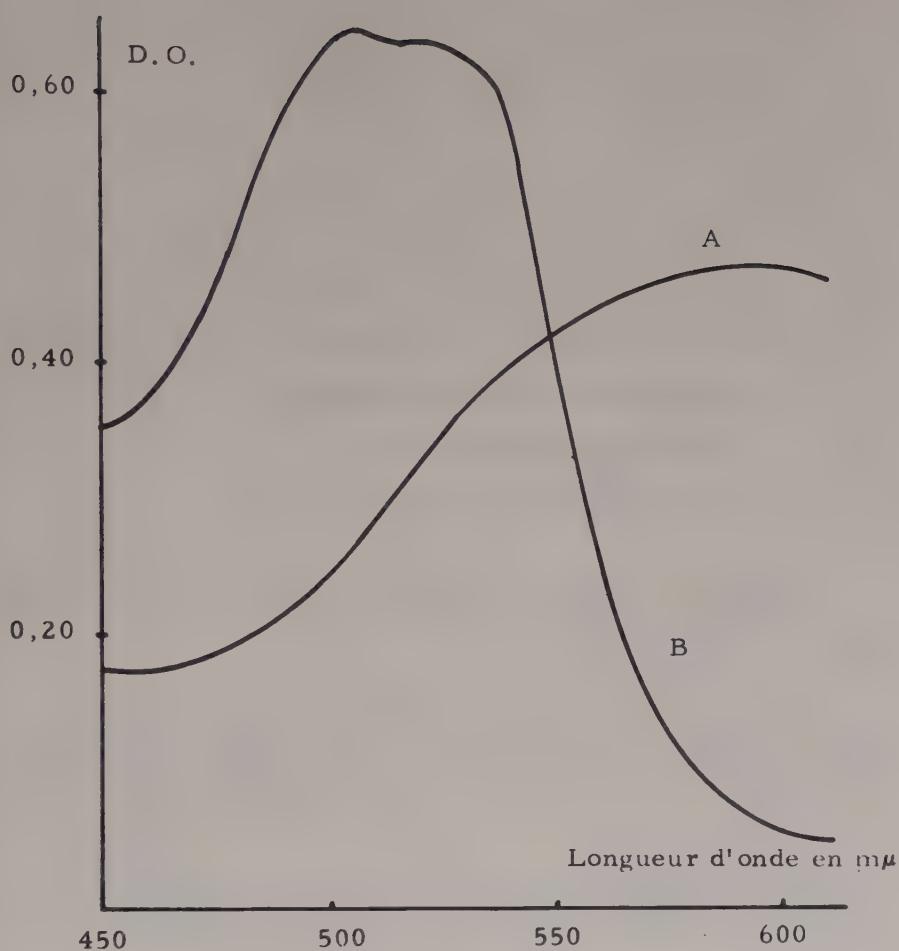


Figure n° 2

A - Spectre d'absorption du Réactif de MANN et YOE

B - Spectre d'absorption de son complexe magnésien

$$(1) \quad D_{505} = D_{505}^1 + D_{505}^2$$

$$(2) \quad D_{600} = D_{600}^1 + D_{600}^2$$

dans lesquelles :

D_{505} = densité optique du mélange réactionnel à 505 m μ

D_{600} = densité optique du mélange réactionnel à 600 m μ

D_{505}^1 = densité optique du complexe magnésien à 505 m μ

D_{600}^1 = densité optique du complexe magnésien à 600 m μ

D_{505}^2 = densité optique du réactif à 505 m μ

D_{600}^2 = densité optique du réactif à 600 m μ

Deux de ces densités optiques D_{505} et D_{600} sont connues ; elles sont lues au spectrophotomètre.

Pour calculer D_{505}^1 , densité optique du complexe, à partir de ce système d'équation, il est nécessaire de disposer de deux équations supplémentaires qui sont obtenues en calculant les rapports k_1 et k_2

$$(3) \quad k_1 = \frac{D_{505}^1}{D_{600}^1} \quad \text{et} \quad (4) \quad k_2 = \frac{D_{600}^2}{D_{505}^2}$$

après avoir mesuré les densités optiques, à 505 et 600 m μ , d'une solution de réactif de MANN et YOE et d'une solution de complexe magnésien en présence d'un excès d'ions magnésium.

Des équations (1) (2) (3) et (4), on peut tirer :

$$D_{505}^1 = \frac{k_1 \cdot k_2}{k_1 \cdot k_2 - 1} \left[D_{505} - \frac{D_{600}}{k_2} \right]$$

La réaction est effectuée dans les conditions indiquées par BOHUON : 10 ml de la solution contenant le magnésium sont tamponnés

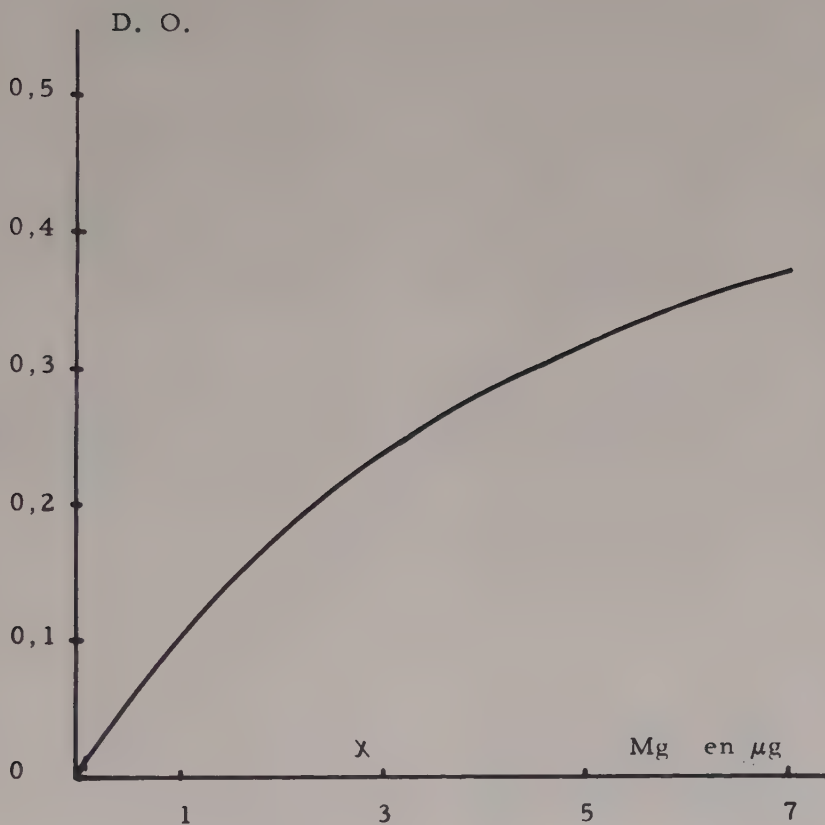


Figure n° 3

Dosage du magnésium par spectrophotométrie
à deux longueurs d'onde - Courbe d'étalonnage

avec 2 ml d'une solution de borate de sodium 0,08 M et additionnés de 5 ml de réactif de MANN et YOÉ ; le volume est complété à 25 ml avec de l'éthanol pur. Après un délai de 30 minutes, les densités optiques sont lues à 505 et 600 m μ , par rapport à l'eau distillée, en cuve de 2 cm.

La courbe de référence est établie avec 1, 3, 5 et 7 μ g de magnésium. (fig. n° 3). Cette courbe n'est pas linéaire, bien que les colorations suivent la loi de BEER-LAMBERT dans ces limites de concentration comme nous l'avons montré précédemment. Ceci indique que la réaction entre le réactif de MANN et YOÉ et le magnésium n'est pas stoechiométrique.

Afin d'expliquer l'allure de la courbe, nous avons recherché si la réaction suit la loi d'action de masse. Dans ce but, nous avons effectué l'essai suivant, en ajoutant à des doses croissantes de magnésium, des quantités du réactif de MANN et YOÉ telles que le rapport des concentrations en magnésium et en réactif reste constant. (Tableau n° 6).

TABEAU n° 6

Numéros des tubes	1	3	5	7
Réactifs		volumes	en ml	
Sol de Mg à 1 μ g/ml	1	3	5	7
Eau distillée	9	7	5	3
Réactif de MANN et YOÉ	1	3	5	7
Borate 0,08 M de sodium	2	2	2	2
Alcool rectifié qsp	25	25	25	25

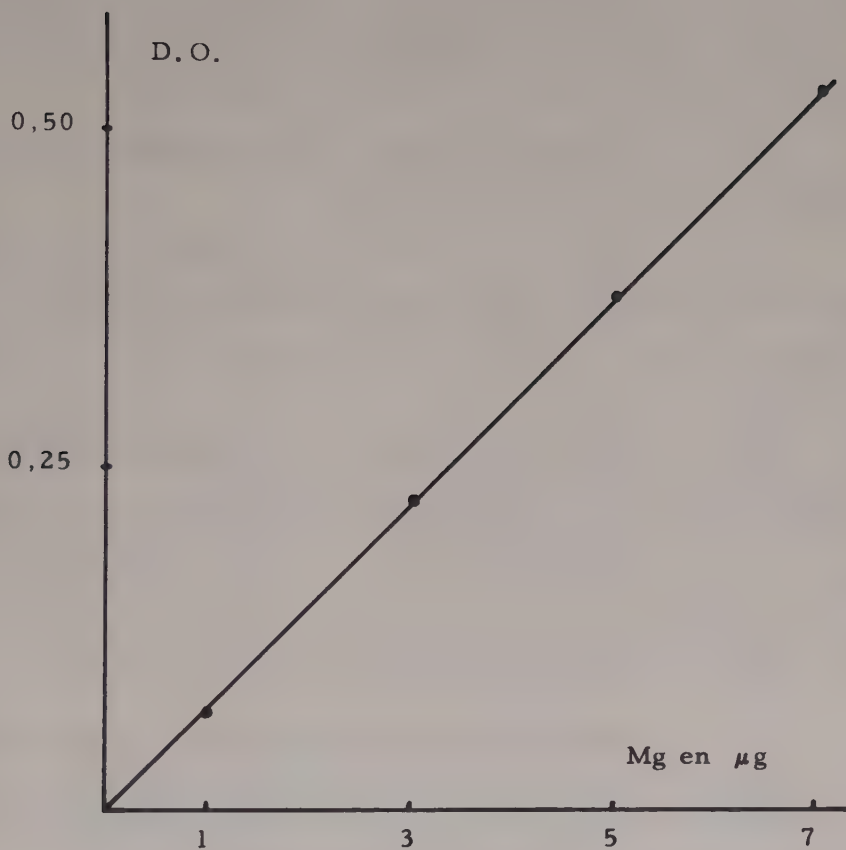


Figure n° 4

Réaction entre le réactif de MANN et YOE et le magnésium

Vérification de la loi d'action de masse

Dans ces conditions, la courbe exprimant la densité optique en fonction de la concentration en magnésium est une droite (figure n° 4) ; la réaction de formation du complexe suit donc la loi d'action de masse.

Dans l'extrait, le taux de magnésium est déterminé sur 0,2 ml de liquide de minéralisation dilués à 10 ml avec de l'eau distillée.

De la valeur trouvée, on retranche la quantité de magnésium contenue dans le liquide de minéralisation témoin.

En outre, comme la courbe de référence n'est pas linéaire, il est indispensable de l'établir en même temps que chaque série de dosages.

Fer.

Nous avons adopté une méthode de microdosage, inspirée de la technique mise au point par HEILMEYER et PLOETNER (75), qui repose sur la formation d'un ion complexe entre le fer (Fe^{2+}) et l'orthophénanthroline. Une autre méthode utilisant le dérivé diphénylé (la bathophénanthroline) présente une plus grande sensibilité, mais nous avons constaté qu'elle donne des résultats moins fidèles.

Dans la méthode d'HEILMEYER et PLOETNER, il est nécessaire d'opérer à un pH voisin de la neutralité pour obtenir une réaction reproductible. On emploie comme indicateur de pH le paranitrophénol qui présente l'avantage d'être incolore dans les conditions opératoires.

Dans un tube jaugé de 10 ml on introduit :

- | | |
|--|----------------|
| - liquide de minéralisation, | 2,5 ml |
| - solution de paranitrophénol à 1 p. 100 | 2 gouttes |
| - ammoniacale pure diluée au demi, goutte à goutte jusqu'à coloration jaune pâle | |
| - solution d'acide sulfurique pur pour Toxicologie 0,1 N, goutte à goutte jusqu'à décoloration | |
| - solution d'hydroxylamine à 10 p. 100, | 0,5 ml |
| - solution d'o-phénanthroline à 1 p. 100, | 1 ml |
| - eau bidistillée | q. s. p. 10 ml |

Le liquide est agité, puis on laisse la coloration se développer au moins une heure avant d'effectuer la spectrophotométrie à $510\text{ m}\mu$, en cuve de 2 cm, par rapport à un essai à blanc préparé dans les mêmes conditions, avec 2,5 ml de liquide de minéralisation témoin.

La courbe de référence est tracée avec des quantités de fer comprises entre 0 et $10\text{ }\mu\text{g}$.

Cuivre.

De très nombreuses méthodes ont été proposées pour le microdosage du cuivre dans les milieux biologiques, mais les plus sensibles et les plus spécifiques sont celles qui sont basées sur la formation des chélates oxalylhydrazidoniques du cuivre. On a proposé comme réactifs : la biscyclohexanone oxalylldihydrazone (cuprizon) (11) (108) et l'oxalylldihydrazide-acétaldehyde (18) plus sensible (19) et qui donne une coloration plus stable dans une gamme de pH plus large (2).

C'est pourquoi nous avons appliqué le mode opératoire préconisé par CAPELLE, qui emploie l'oxalylldihydrazide-acétaldehyde (18).

Dans un tube jaugé de 10 ml, on mesure :

- liquide de minéralisation	2,5 ml
- solution de citrate d'ammonium à 15 p.100	1 ml
- solution d'acétaldehyde à 40 p.100	2 ml
- solution d'oxalylldihydrazide à 0,25 p.100	1 ml
- ammoniacque pure	1 ml
- eau bidistillée q.s.p.	10 ml

Après agitation la densité optique est mesurée à $540\text{ m}\mu$ en cuve de 2 cm, au bout d'un délai de 30 mn, par rapport à un essai à blanc, préparé dans les mêmes conditions avec 2,5 ml de liquide de minéralisation témoin.

La courbe de référence est établie avec 2,5, 5, 7,5 et $10\text{ }\mu\text{g}$ de cuivre.

Manganèse.

La plupart des méthodes colorimétriques de microdosage du manganèse sont des variantes de celle proposée par Gabriel BERTRAND qui repose sur l'oxydation des ions manganèse en ions permanganate (MnO_4^-). Elles diffèrent entre elles par la nature de l'agent oxydant employé. On a proposé le persulfate de potassium (BOYD) (14), le bismuthate de sodium ou mieux le periodate de sodium (COOPER) (26). Ces méthodes sont très sensibles et très spécifiques du manganèse.

Dans la technique que nous avons utilisée (55), l'oxydation est effectuée par le périodate de sodium en milieu sulfophosphorique, afin d'éliminer l'interférence des ions ferriques. Les mesures spectrophotométriques sont faites à 545 m μ .

Dans un tube jaugé de 10 ml, on mesure :

- liquide de minéralisation	6 ml
- solution aqueuse d'acide sulfurique pur à 10 p. 100 et d'acide phosphorique à 15 p. 100	2 ml
- solution de périodate de sodium à 5 p. 100 dans l'acide sulfurique à 10 p. 100	2 ml

On porte au bain marie bouillant pendant 10 mn ; après refroidissement, on ajuste à 10 ml avec de l'eau fraîchement bidistillée. La mesure spectrophotométrique est effectuée en cuve de 2 cm, par rapport à un essai à blanc préparé dans les mêmes conditions avec 6 ml de liquide de minéralisation témoin.

La courbe de référence est établie avec 5, 10, 15, 20 et 25 μg de manganèse.

Zinc.

La polarographie est la méthode de choix pour le microdosage du zinc. Divers électrolytes de base ont été proposés : sels alcalins, nitrates, chlorures, tiocyanates (84).

Celui que nous avons utilisé est indiqué par REED et CUMMINGS (62) ; il est composé d'une solution d'acétate d'ammonium 0,1 M et de thio-cyanate de potassium 0,025 M, ajustée à pH 4,6 à l'aide d'acide acétique.

Etant donné l'acidité du liquide de minéralisation, il est nécessaire d'en extraire le zinc, sous forme de dithizonate ; le complexe est ensuite minéralisé par calcination à 400° C en présence d'acide nitrique, puis dissout dans l'électrolyte de base. Pour extraire complètement le zinc avec la dithizone, il est nécessaire d'opérer à un pH voisin de la neutralité (21).

Dans une ampoule à décantation, 10 ml de liquide de minéralisation sont neutralisés par la soude, puis la solution obtenue est agitée avec une solution chloroformique de dithizone à 0,01 p. 100, utilisée par fraction de 5 ml, jusqu'à ce que la phase organique conserve la teinte verte du réactif. La solution chloroformique est recueillie dans un creuset de silice ; le chloroforme est évaporé à l'étuve à 60° et le résidu est calciné à 400°, en présence de quelques gouttes d'acide nitrique.

Le contenu du creuset est repris par 5 ml d'électrolyte de base. La polarographie est effectuée sur une fraction aliquote (2 ml) de cette solution, entre -0,8 et -1,3 V. (potentiel de demi-vague : -1,03 V). Un second polarogramme est enregistré après addition d'une surcharge de 10 μ g de zinc. La quantité de zinc recherchée est calculée en tenant compte de la dilution apportée par l'addition de la surcharge.

Du résultat, on retranche la quantité de zinc trouvée dans le même volume de liquide de minéralisation témoin.

3 - COMPOSES ORGANIQUES :

Bien que l'azote, le soufre et le phosphore soient des éléments minéraux, nous les avons classés dans ce chapitre, car ils entrent pour une grande partie dans la composition de molécules organiques des milieux biologiques.

A) Azote total :

L'azote a été dosé selon la microméthode de Kjeldahl : minéralisation par l'acide sulfurique, à chaud, en présence de sulfate de potassium et de sulfate de cuivre ; l'ammoniaque formée est séparée par entraînement à la vapeur d'eau et dosée dans le distillat par potentiométrie.

Dans un matras de Kjeldahl, on introduit :

- extrait	2 ml
- acide sulfurique pur	5 ml
- sulfate de potassium pur	3 g
- sulfate de cuivre pur	25 mg

Le liquide est maintenu à douce ébullition jusqu'à décoloration, puis le chauffage est poursuivi pendant encore une demi-heure.

Après refroidissement, le liquide de minéralisation est dilué avec un peu d'eau distillée et transvasé dans un appareil de PARNAS et WAGNER, en vue de la séparation de l'ammoniaque. Le distillat est recueilli dans un bécher de 100 ml portant un trait de jauge à 50 ml et contenant 15 ml d'une solution d'acide borique à 4 p. 100. La distillation est arrêtée lorsque le volume du liquide contenu dans le Bécher atteint le trait de repère.

L'ammoniaque est titrée par addition d'une solution d'acide sulfurique 0,02 N jusqu'à pH 5,4 mesuré par la méthode électrométrique. Ce pH correspond à celui enregistré au cours d'un essai à blanc, dans lequel le liquide de minéralisation est remplacé par de l'eau distillée.

Le titre de la solution d'acide sulfurique est contrôlé au cours

d'un dosage témoin réalisé dans les mêmes conditions sur 10 ml d'une solution d'oxalate d'ammonium à 1,421 g/litre (0,28 mg d'azote par ml).

B) Soufre total :

Le soufre est oxydé en ions SO_4^{2-} par minéralisation nitroperchlorique, suivant la technique de LACHICA GARRIDO (66), puis dosé par turbidimétrie à l'état de sulfate de baryum, en présence de Tween 80 comme agent de dispersion, ainsi que le préconisent BLANC, BERTRAND et LIANDIER (9).

Dans un matras de 20 ml, on évapore à sec 1 ml d'extrait. Le résidu est additionné de 1 ml d'un mélange d'acide perchlorique et d'acide nitrique purs (40/60, v/v), de 0,1 ml d'une solution de bichromate de potassium à 30 g par litre et de 0,2 ml d'une solution de métavanadate d'ammonium dans l'acide perchlorique à 1,5 g par litre. Le matras est chauffé doucement au bain de sable jusqu'à disparition de l'acide nitrique. Après refroidissement, on ajoute 0,5 ml d'acide nitrique pur et on chauffe à nouveau jusqu'à disparition de l'acide nitrique. Lorsqu'il est refroidi, le contenu du matras est transvasé dans une fiole jaugée de 50 ml, ainsi que les liquides de rinçage (3 fois 5 ml d'eau distillée). On ajoute alors 5 ml de réactif précipitant constitué par une solution de chlorure de baryum à 10 p.100 dans une solution aqueuse de Tween 80 à 20 p.100. Le volume est ajusté à 50 ml par addition d'eau distillée et le mélange est agité énergiquement. La densité optique est mesurée après un délai de 30 à 40 mn, par rapport à un essai à blanc contenant les mêmes quantités d'acide perchlorique, de bichromate de potassium et de métavanadate d'ammonium.

La courbe de référence est établie dans les mêmes conditions avec une solution aqueuse de sulfate de potassium pur contenant 400 μg de soufre par ml. La quantité de soufre est une fonction linéaire de la densité optique entre 0 et 800 μg .

C) Phosphore total :

Après destruction de la matière organique par l'acide sulfurique à chaud en présence de perhydrol, l'ion PO_4^{3-} est dosé par une méthode spectrophotométrique reposant sur la réduction du complexe phosphomolybdique par l'hydrazine à chaud (13).

Dans un ballon à col rodé de 50 ml, on mesure 2 ml d'extrait et 0,5 ml d'acide sulfurique pur. On chauffe jusqu'à l'apparition de vapeurs blanches, puis on adapte sur le ballon un réfrigérant et on poursuit le chauffage jusqu'à noircissement. Après refroidissement, on introduit par la partie supérieure du réfrigérant 0,5 ml de perhydrol pur et on chauffe pendant 4 heures. Lorsque la minéralisation est terminée, on ajoute 20 ml d'eau distillée par le haut du réfrigérant et le liquide est porté à ébullition pendant 30 mn pour hydrolyser l'acide pyrophosphorique.

Lorsque le liquide est refroidi, il est neutralisé par la lessive de soude diluée au quart, en présence de phénolphthaléine, jusqu'à apparition d'une teinte rose que l'on fait disparaître avec une quantité juste suffisante d'acide sulfurique 0,1 N. La solution est ajustée à 50 ml avec de l'eau distillée.

Pour le dosage de l'ion PO_4^{3-} dans un tube jaugé à 20 ml, on mesure 5 ml de liquide de minéralisation, 4 ml du réactif préparé extemporanément en mélangeant 10 ml d'une solution aqueuse de sulfate d'hydrazine à 0,15 p. 100, 25 ml d'une solution de molybdate de Na à 2,5 p. 100 dans l'acide sulfurique pur dilué au quart et en complétant à 100 ml avec de l'eau distillée. Le volume est ajusté à 20 ml avec de l'eau distillée ; on porte au bain marie bouillant pendant 10 mn, puis on refroidit sous un courant d'eau froide. La densité optique est mesurée à 750 m μ par rapport à un essai à blanc effectué sur 5 ml d'eau distillée.

La coloration suit la loi de BEER-LAMBERT pour des concentrations allant de 0 à 40 μg de phosphore. La courbe d'étalonnage est établie dans des conditions identiques à celles du dosage avec une solution aqueuse de phosphate diacide de potassium, correspondant à 10 μg de phosphore par ml.

D) Azote α -aminé :

L'estimation de l'ensemble des acides aminés libres dans un milieu biologique complexe est, en général, ramenée au dosage de l'azote de la fonction aminée située en α du groupement carboxyle (azote α -aminé).

Comme cette forme de l'azote ne représente, le plus souvent, qu'une faible fraction de l'azote total des milieux biologiques, il est nécessaire de disposer d'une méthode de dosage d'une grande sensibilité ; celle qui satisfait le mieux à cette condition repose sur l'emploi de la ninhydrine, après élimination des protéines et des polypeptides. La ninhydrine réagit avec le groupement α aminé des amino-acides pour donner des aldéhydes, de l'anhydride carbonique et de l'ammoniac. Le dosage est terminé par la mesure de l'anhydride carbonique dégagé (52) ou par le dosage de l'ammoniac formé (100). La technique la plus simple et la plus rapide à mettre en oeuvre est celle recommandée par MICHEL (74), dans laquelle, l'ammoniac est titré par acidimétrie après séparation par microdiffusion. La déprotéinisation peut être réalisée par précipitation à l'aide de l'éthanol ou d'un acide (sulfurique, trichloracétique, etc.).

La précipitation par l'éthanol, ainsi que l'a montré MICHEL, présente plusieurs avantages : elle s'effectue en milieu neutre, à basse température, ce qui limite la dégradation des substances fragiles ; de plus, l'éthanol est volatil, facile à éliminer par évaporation, ce qui permet de concentrer le milieu et d'accroître la sensibilité du dosage.

Malgré ces avantages, cette méthode n'est pas parfaite ; les polypeptides de faible poids moléculaire ne sont pas précipités par l'éthanol et leur présence constitue une cause d'erreur par excès ; par contre, certains aminoacides et oligopeptides échappent partiellement (proline) ou totalement (alanine, leucylglycylglycine) à la dégradation par la ninhydrine, ce qui entraîne une légère erreur par défaut.

Dans un Erlenmeyer de 250 ml, on mesure 90 ml d'éthanol pur refroidi à $+4^{\circ}$, puis on ajoute, en agitant continuellement, 10 ml d'extrait ;

on laisse la précipitation s'effectuer à une température voisine de $+ 4^{\circ}\text{C}$, pendant 30 mn. Le précipité isolé par centrifugation est lavé avec quelques ml d'éthanol à 90° et les liquides de lavage sont joints au surnageant. La solution alcoolique est évaporée sous pression réduite à une température inférieure à 40°C . Le résidu est repris par une solution tampon de pH 2,35, à base d'acide citrique, de citrate de sodium et d'acide ascorbique, de manière à obtenir un volume de 10 ml.

A une fraction aliquote de cette solution (5 ml) on ajoute 50 mg de ninhydrine pure et on porte au bain-marie bouillant pendant 15 mn. Après addition de 0,5 ml de perhydrol, le tube est placé à nouveau pendant 5 mn dans le bain-marie. Lorsque le liquide est refroidi, il est transvasé dans un appareil à microdiffusion de LE MOAN (67). L'ammoniac déplacé par la lessive de soude est capté dans 15 ml d'une solution d'acide borique à 4 p. 100. Le dosage est poursuivi selon la technique indiquée pour le dosage de l'azote total.

E) Protéines :

Les protéines sont dosées par la méthode du biuret, spécifique des liaisons peptidiques, après avoir été séparées par précipitation en milieu alcoolique. Cette séparation est indispensable pour éliminer les substances biurétogènes qui peuvent interférer dans le dosage. Dans le cas présent, nous avons utilisé le précipité obtenu lors de la déprotéinisation de l'extrait en vue du dosage de l'azote α aminé.

Le culot de centrifugation, provenant de la précipitation par l'éthanol de 10 ml d'extrait, est repris par 2 ml d'eau distillée et 8 ml de réactif cuprotartrique de GORNALL (38) (44) ; le liquide est agité jusqu'à dissolution complète et laissé en repos pendant 45 mn, à la température du laboratoire. La mesure spectrophotométrique est faite à $540\text{ m}\mu$ par rapport à un essai à blanc préparé avec 2 ml d'eau distillée et 8 ml de réactif de GORNALL.

L'échantillon de référence est constitué par les protéines que nous avons isolées de l'extrait par précipitation au moyen de l'éthanol à

froid : 50 ml d'extrait sont versés goutte à goutte dans 450 ml d'éthanol pur; le précipité est recueilli par centrifugation, lavé avec un mélange hydroalcoolique (1/9, v, v) et séché sous vide phosphorique. Une partie du résidu de l'ordre de 40 mg est pesée avec précision et dissoute dans 20 ml d'une solution aqueuse à 80 p. 100 de réactif de GORNALL. Une gamme d'étalonnage est préparée en diluant cette solution mère avec la même dilution de réactif de GORNALL. A partir des résultats obtenus, on trace la courbe exprimant la valeur de la densité optique en fonction des concentrations en protéines.

F) Lipides :

Etant donné la richesse de l'extrait en sels biliaires, les méthodes d'extraction habituelles, comme celles de DELSAL (33) GARTON (41) VERKAMPF (117) KOGL (61) ne sont pas utilisables. En effet, les solvants n'étant jamais parfaitement anhydres, ils dissolvent des traces de sels biliaires, qui viennent augmenter le poids du résidu lipidique ; c'est pourquoi, nous avons dû adopter la méthode particulière suivante :

50 ml d'extrait sont mélangés à 450 ml d'éthanol pur et le précipité est éliminé par centrifugation. Le liquide surnageant est évaporé sous pression réduite et le résidu est desséché sous vide phosphorique. Il est redissout dans 20 ml d'éthanol pur ; la solution est alors additionnée de 180 ml d'éther pur. Le précipité de sels biliaires est séparé par centrifugation. La solution éthéroalcoolique, évaporée sous pression réduite, laisse un résidu qui est desséché sous vide phosphorique, puis repris par l'éther de pétrole (quatre fractions de 10 ml). La solution obtenue est évaporée dans une capsule tarée et le résidu est desséché sous vide phosphorique jusqu'à poids constant. Dans certains cas, une seconde purification par l'éther de pétrole s'est avérée nécessaire.

G) Stérols (évalués en cholestérol) :

Nous avons appliqué la méthode au perchlorure de fer en milieu

acétique et sulfurique de ZLATKIS et ZAK (127) selon la technique proposée par ASSOUS et GIRARD (1). Le cholestérol ainsi que de nombreux stérols donnent avec le perchlorure de fer, en milieu acide convenablement choisi, une coloration dont le spectre présente un maximum vers $560\text{ m}\mu$ et qui se prête à un dosage spectrophotométrique.

Les lipides isolés de 50 ml d'extrait en vue de leur dosage gravimétrique, sont dissous dans 20 ml de chloroforme rectifié. Dans deux tubes, on introduit 1 ml de la solution lipidique et on évapore le chloroforme au bain-marie bouillant. Après refroidissement, on mesure dans l'un des tubes (témoin) 3 ml d'acide acétique pur * et dans l'autre tube (dosage) 2,8 ml d'acide acétique pur et 0,2 ml d'une solution de chlorure ferrique à 1 g pour 100 ml d'acide acétique pur. On ajoute alors lentement 2 ml d'acide sulfurique concentré dans chaque tube. On agite énergiquement, on laisse en repos au moins une demi-heure, puis on effectue la lecture spectrophotométrique à $560\text{ m}\mu$ par rapport à un essai à blanc préparé avec 2,8 ml d'acide acétique, 0,2 ml de solution de chlorure ferrique à 1 p. 100 dans l'acide acétique et 2 ml d'acide sulfurique. La différence de densité optique obtenue entre le tube dosage et le tube témoin est comparée à celles obtenues avec 25, 50, 75 et 100 μg de cholestérol.

H) Sels biliaires :

La méthode la plus simple et la plus rapide est, dans le cas présent, celle qui utilise la spectrophotométrie dans l'ultraviolet (73). Etant donné la richesse de l'extrait en sels biliaires, il est inutile de procéder à une purification préalable, ce qui entraîne une simplification importante de la méthode du dosage.

* L'acide acétique MERCK "glacial pour analyse, indifférent à l'acide chromique" peut être utilisé sans purification.

En solution neutre ou alcaline faiblement concentrée, les sels biliaires n'absorbent pas les radiations ultraviolettes de longueurs d'onde voisines de $300\text{ m}\mu$. Par contre, en milieu sulfurique concentré (65 p.100), le spectre de tous les acides biliaires présente un intense maximum d'absorption à $318\text{ m}\mu$. Certains acides (désoxycholique et cholique) absorbent en outre plus faiblement les radiations de $380\text{ m}\mu$ de longueur d'onde (figures n° 5 b et n° 5 c).

L'extrait dilué à 1 p. 500 dans l'acide sulfurique à 65 p.100 fournit un spectre d'absorption qui présente un seul maximum à $318\text{ m}\mu$, analogue à celui de l'acide glycocholique et de l'acide taurocholique, sans fond spectral appréciable en dehors de la région où se situe le maximum (figure n° 5 a). Il est par conséquent possible d'effectuer le dosage des acides biliaires contenus dans l'extrait en mesurant la densité optique d'une dilution au 1.500ème dans l'acide sulfurique à 65 p.100, par rapport à l'acide sulfurique de même concentration.

Etant donné que les coefficients d'extinction moléculaire des acides glycocholique et taurocholique sont différents, nous avons dû préparer un produit de référence à partir de l'extrait. Dans ce but, l'isolement du mélange de sels biliaires est réalisé sur le liquide hydroalcoolique provenant de la préparation de l'échantillon de protéines de référence. La solution concentrée sous pression réduite est évaporée et séchée sous vide phosphorique. Le résidu d'évaporation est repris par 20 ml d'éthanol pur ; la fraction insoluble (sels minéraux, glucides, etc.) est éliminée par centrifugation. Au liquide clair, on ajoute 180 ml d'éther éthylique pur ; les sels biliaires précipitent ; ils sont recueillis par centrifugation, lavés à l'éther éthylique et séchés sous vide phosphorique.

Une solution titrée est préparée en dissolvant dans l'éthanol pur un poids déterminé du mélange de sels biliaires desséchés ainsi séparé.

Pour préparer la gamme de référence, on évapore dans une série de tubes jaugés, des volumes de solution allant de 0,2 à 1 ml ; après refroidissement les résidus d'évaporation sont repris par un volume déterminé d'acide sulfurique à 65 p.100.

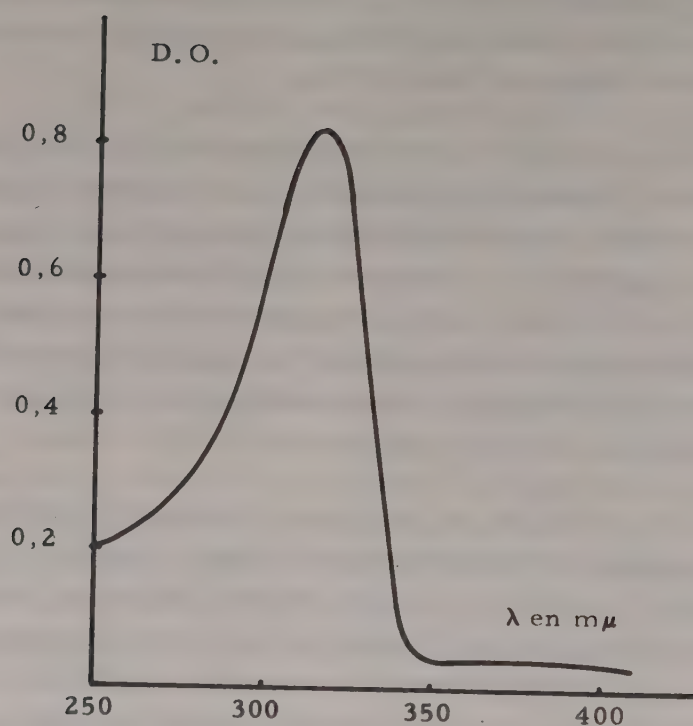


Figure n° 5 a

Spectre d'absorption de l'extrait dilué à 1 p. 500

dans l'acide sulfurique à 65 p. 100

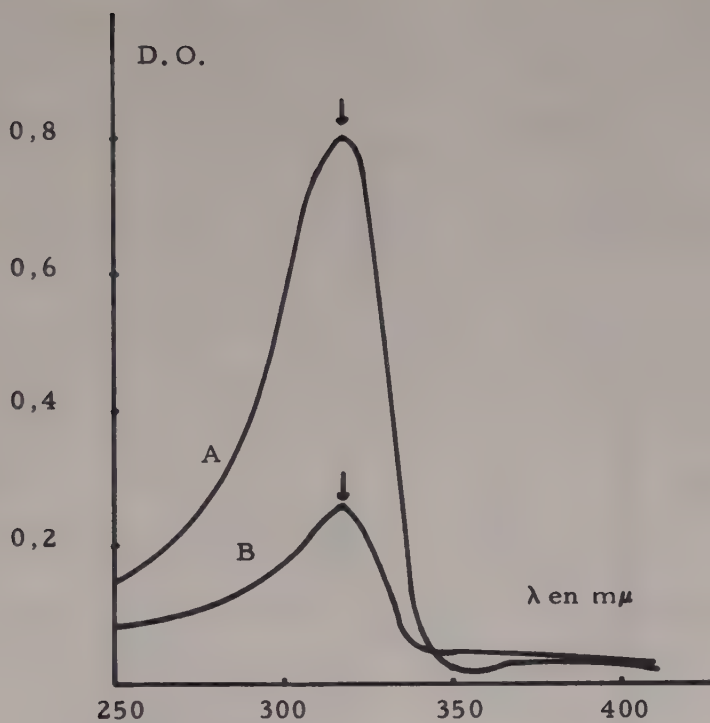


Figure n° 5 b

A - Spectre d'absorption de l'acide glycocholique
dans l'acide sulfurique à 65 p. 100

B - Spectre d'absorption de l'acide taurocholique
dans l'acide sulfurique à 65 p. 100

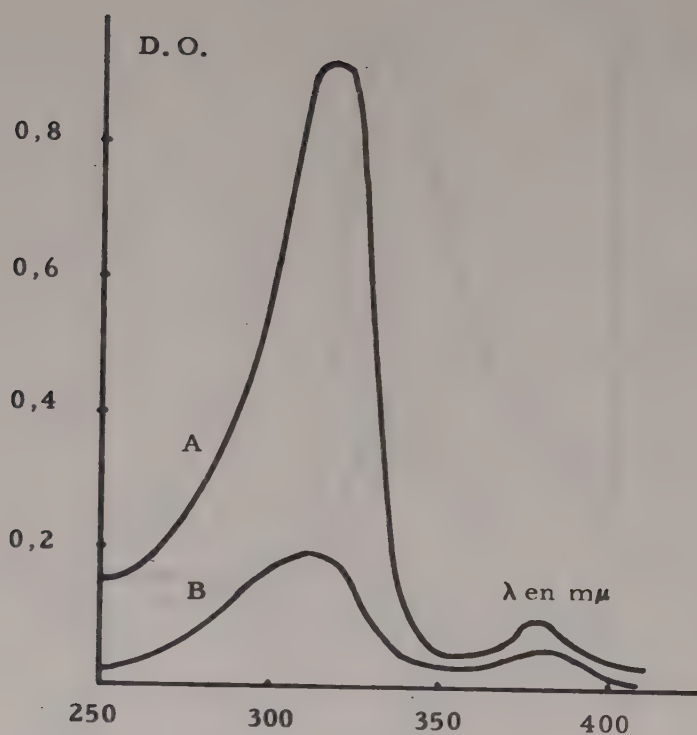


Figure n ° 5 c

A - Spectre d'absorption de l'acide cholique dans l'acide sulfurique à 65 p. 100

B - Spectre d'absorption de l'acide désoxycholique dans l'acide sulfurique à 65 p. 100

I - Glucides réducteurs :

Parmi les nombreuses techniques utilisées, nous avons choisi celle de SOMOGYI et NELSON, recommandée par DEBRIS (68) pour les raisons suivantes : les oses sont pratiquement les seuls agents réducteurs que la défécation n'élimine pas et la coloration est très stable.

Après défécation, on met à profit le pouvoir réducteur des oses, à chaud et en milieu alcalin, vis-à-vis des ions Cu^{2+} .

La quantité d'oxyde cuivreux produit par la réaction est mesurée grâce à la formation d'un complexe coloré en bleu obtenu par addition de réactif arséno-molybdique. L'intensité de la coloration formée est mesurée à $660 \text{ m}\mu$.

- Dosage des glucides réducteurs libres :

Dans un tube à centrifuger, on introduit, en mélangeant après chaque addition de réactif :

- extrait	2 ml
- eau distillée	6 ml
- solution de baryte 0,3 N	1 ml
- solution de sulfate de zinc à 5 p. 100	1 ml

Après centrifugation, on prélève 2 ml de liquide surnageant auxquels on ajoute 2 ml de réactif cupro-alcalin de SOMOGYI. Le mélange est agité, porté au bain-marie bouillant pendant 10 mn et refroidi rapidement dans l'eau glacée. On ajoute ensuite 2 ml de réactif arséno-molybdique et on complète à 20 ml avec de l'eau distillée. Les densités optiques sont lues, après un délai d'au moins 15 mn, à $660 \text{ m}\mu$, en cuve de 1 cm, par rapport à un essai à blanc préparé avec 2 ml d'eau distillée.

La gamme de référence est obtenue en traitant dans les mêmes conditions 2 ml de solution contenant 10, 20, 30, 40 et 50 $\mu\text{g/ml}$ de glucose.

- Dosage des glucides réducteurs totaux :

Le dosage est pratiqué après libération des sucres combinés par hydrolyse acide. Il est d'usage d'utiliser à cette fin l'acide chlorhydrique ou l'acide sulfurique.

Nous rapportons dans le tableau n° 7 les résultats obtenus avec ces deux acides pour différentes concentrations et pour des temps d'hydrolyse de 1, 2 et 3 heures. Après neutralisation de l'hydrolysate par la soude N, les sucres réducteurs sont dosés selon la technique indiquée pour les sucres libres. D'après ces résultats, la meilleure hydrolyse est réalisée avec l'acide chlorhydrique 0,5 N pendant 2 heures ; avec des acidités plus fortes ou des temps d'hydrolyse plus prolongés, une fraction des oses est détruite, cette action étant plus intense avec l'acide sulfurique qu'avec l'acide chlorhydrique. Ces conditions sont très proches de celles indiquées par GILES et ses collaborateurs, qui effectuent l'hydrolyse du complexe osidique de la bile pendant 2 heures et en milieu chlorhydrique N.

Durée de l'hydrolyse	Acidité du milieu	Sucres réducteurs en $\mu\text{g/ml}$	
		avec HCl	avec H_2SO_4
1 h	0,05 N	345	350
	0,5 N	494	430
	N	355	366
2 h	0,05 N	380	313
	0,5 N	505	470
	N	482	358
3 h	0,05 N	402	411
	0,5 N	500	418
	N	445	347

TABLEAU n° 7

II - RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats des analyses sont rassemblés dans le tableau n° 8.

1 - RESIDU SEC ET CENDRES :

Les taux du résidu sec et des cendres restent compris entre des limites étroites, ce qui traduit une bonne reproductibilité de la préparation. Ce fait n'est pas surprenant puisque tous les extraits sont obtenus par le même procédé, à partir d'un grand nombre de vésicules (100 au minimum) provenant d'animaux d'âges voisins (5 à 7 mois).

2 - COMPOSES MINERAUX :

On retrouve dans l'extrait les principaux éléments minéraux qui entrent dans la composition de la matière vivante : Na - K - Ca - Mg - Cl - P - S - Fe.

La faible teneur en fer de l'extrait mérite d'être soulignée. De ce fait, l'extrait ne peut renfermer que des traces d'hémoglobine, même en admettant que tout le fer se trouve sous forme de ce pigment sanguin. La présence d'hémoglobine seulement à l'état de traces signifie que les vésicules sont pratiquement exsangues au moment de leur prélèvement, ce qui se conçoit fort bien si l'on considère la structure anatomique de la vésicule et les phénomènes physiologiques qui interviennent lors de l'abattage des animaux : la vésicule est irriguée par un réseau de capillaires très fins et, lorsque les animaux sont saignés, le sang est expulsé de l'organe sous l'effet conjugué de la chute de la pression sanguine et de la contre-pression exercée par la bile sur les vaisseaux capillaires.

Dans ces conditions, l'extrait ne peut renfermer que des traces infimes de protéines sanguines, fait qui doit être rapproché de l'absence d'action sensibilisante que nous avons déjà signalée à propos de son expérimentation chez l'animal.

TABLEAU n° 8

Caractères généraux	Nombre de déterminations N	Moyenne $\bar{x}$	Ecart type σ	Ecart de confiance $\bar{x} \pm 2,58\sigma_m$
pH	11	6,45	0,10	6,45 $\pm$ 0,08
Δ	20	- 0,189	0,010	-0,189 $\pm$ 0,006
Résidu sec	21	22,5 mg/ml	1,22	22,5 mg/ml $\pm$ 0,68
<u>Composition chimique</u> <u>du résidu sec</u>				
Cendres	10	147,4 mg/g	9,1	147,4 $\pm$ 7,4
Chlore	12	28,0 mg/g	5,0	28,0 $\pm$ 3,7
Sodium	16	50,8 mg/g	5,56	50,8 $\pm$ 3,6
Potassium	10	7,8 mg/g	0,82	7,8 $\pm$ 0,67
Calcium	10	0,77 mg/g	0,15	0,77 $\pm$ 0,12

TABLEAU n° 8

	N	$\bar{x}$	σ	$x \pm 2,58\sigma_m$
Magnésium	19	97 $\mu\text{g/g}$	12,2	97 $\pm$ 7
Fer	14	25 $\mu\text{g/g}$	5,55	25,1 $\pm$ 3,8
Cuivre	16	21,3 $\mu\text{g/g}$	4,46	21,3 $\pm$ 2,9
Zinc	12	58,7 $\mu\text{g/g}$	18,9	58,7 $\pm$ 14,0
Manganèse	14	19,3 $\mu\text{g/g}$	3,96	19,3 $\pm$ 2,7
Azote total	13	47,9 mg/ g	7,08	47,9 $\pm$ 5,1
Soufre total	15	27,3 mg/ g	4,02	27,3 $\pm$ 2,7
Phosphore total	15	8,4 mg/g	1,35	8,4 $\pm$ 0,9
Azote aminé	14	6,03 mg/ g	0,85	6,03 $\pm$ 0,59
Protéines	15	91,6 mg/ g	10,9	91,6 $\pm$ 7,3

TABLEAU n° 8

	N	$\bar{x}$	σ	$\bar{x} \pm 2,58 \sigma_m$
Glucides réducteurs totaux	16	21,8 mg/g	3,0	$21,8 \pm 1,9$
Glucides réducteurs libres	17	13,8 mg/g	1,34	$13,8 \pm 0,8$
Lipides totaux	13	46,2 mg/g	7,9	$46,2 \pm 5,6$
Stérols (en choles- térol)	10	1,96 mg/g	0,17	$1,96 \pm 0,14$
Sels biliaires	16	744 mg/g	27,1	744 ± 17

Dans l'extrait, on retrouve des oligo-éléments (cuivre, zinc, manganèse), mais à des concentrations qui ne permettent pas de leur attribuer un rôle physiologique spécial. En revanche, nous n'avons pas décelé la présence de cobalt, même en utilisant une méthode aussi sensible que la spectrographie d'émission dans l'ultra-violet.

3 - COMPOSES ORGANIQUES :

A) Sels biliaires :

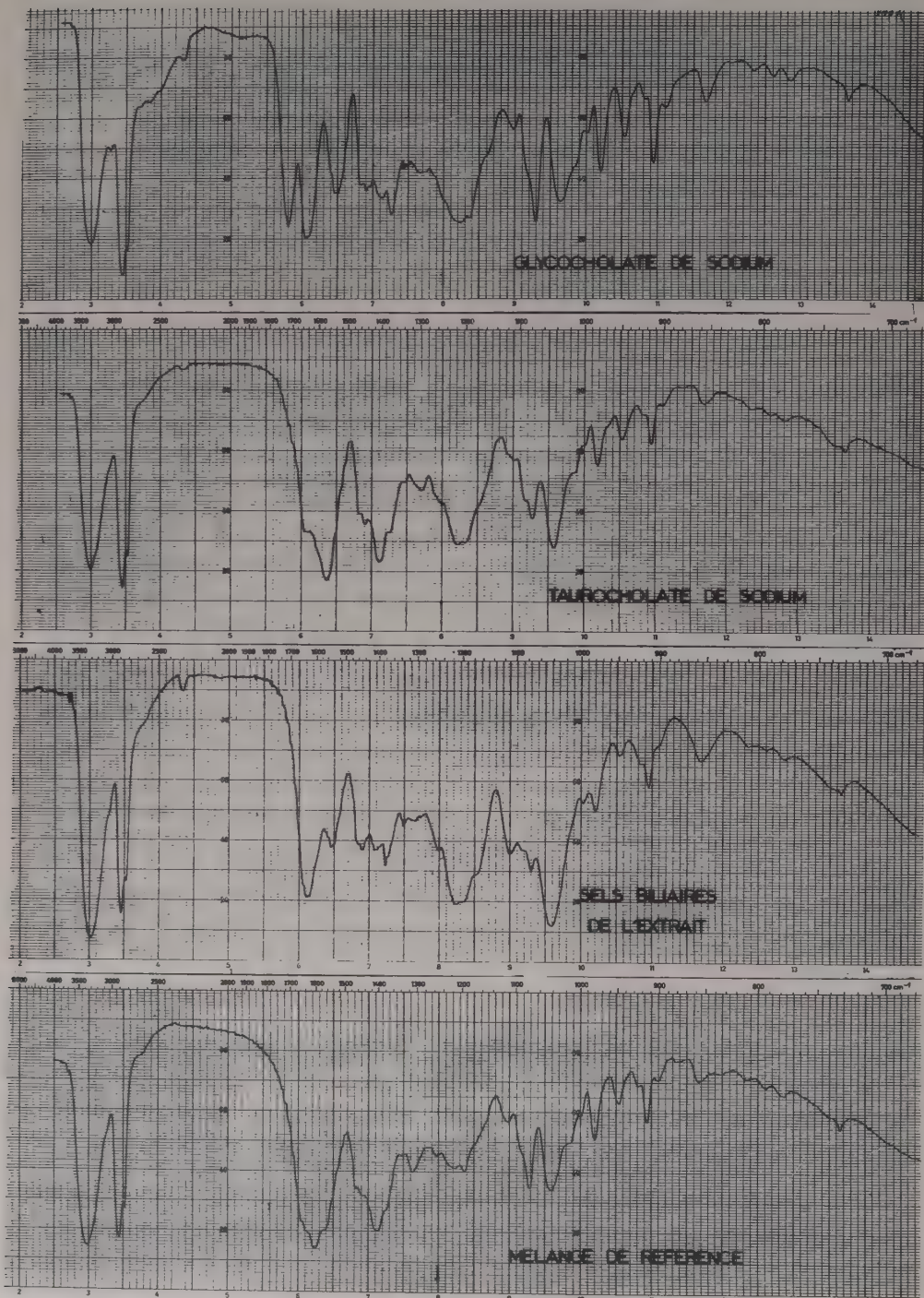
Comme il était à prévoir, l'extrait préparé à partir d'un organe qui se trouve en contact direct avec la bile renferme une très forte proportion de sels biliaires (744 mg/g de résidu sec).

Les sels biliaires ainsi obtenus, en solution dans l'acide sulfurique à 65 p.100 fournissent un spectre d'absorption dans l'ultra-violet qui présente un seul maximum à 318 m μ (figure n° 5 a) comme ceux de l'acide glycocholique et de l'acide taurocholique. L'absence d'un second maximum à 380 m μ permet de conclure que le mélange ne renferme pas ou seulement des traces d'acide cholique ou désoxycholique.

Par ailleurs, nous avons trouvé 2,9 p.100 de soufre dans le mélange de sels biliaires que nous avons isolé de l'extrait et utilisé comme produit de référence. Ce taux correspondrait à une teneur en taurocholate de sodium de 50,3 p.100 dans le mélange puisque ce sel contient 5,76 p.100 de soufre.

On pourrait alors penser que l'acide glycocholique représente le second des principaux constituants du mélange, puisque la bile des herbivores renferme surtout des glycocholates et des taurocholates. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons enregistré le spectre dans l'infra-rouge (2 à 13 μ) des sels biliaires isolés de l'extrait. A cette fin, 3 mg de produit anhydre ont été mélangés au porphyre avec 800 mg de bromure de potassium sec, puis la poudre a été mise sous forme de pastille par compression. Nous avons comparé le spectre obtenu avec celui que nous a fourni un

Figure n° 6 - Spectres Infra-Rouges -



mélange à parties égales de glycocholate et de taurocholate de sodium dissous dans l'alcool et précipité dans des conditions identiques à celles qui ont servi à l'isolement des sels biliaires de l'extrait. Cette comparaison fait ressortir de nombreuses différences entre les 2 spectres (figure n° 6). En effet, on ne retrouve pas sur le spectre du mélange inconnu les maximum caractéristiques du taurocholate à 6,3, 7,1 et 7,5 μ , qui existent sur le spectre du mélange de référence. On doit donc admettre que le mélange de sels biliaires isolés de la vésicule ne contient pas, ou seulement très peu, d'acide taurocholique, mais qu'il renferme un acide biliaire sulfonique différent qui représente peut-être un intermédiaire dans le métabolisme de l'acide taurocholique.

B) Glucides réducteurs :

Les glucides réducteurs totaux représentent une faible partie du résidu sec (2,18 p.100) dont plus de la moitié se trouve à l'état libre (1,38 p.100).

C) Lipides :

Les lipides totaux se trouvent à une teneur environ 10 fois supérieure à celle du sang (5 p.100). Cette concentration importante pour une solution aqueuse n'est cependant pas surprenante, car la richesse du milieu en sels biliaires augmente fortement la solubilité des composés lipidiques dans l'eau.

D) Stérols :

Le taux des stérols évalués en cholestérol (2 mg/g) paraît faible, car le rapport cholestérol/lipides totaux (0,04) est inférieur à celui qui a été trouvé pour la bile (0,07) (Tableau n° 1).

E) Protéines :

Le résidu sec de l'extrait vésiculaire renferme 9,16 p.100 de protéines précipitables par l'éthanol à 90 p.100. Le dosage de l'azote total

dans ce précipité a montré qu'il renferme $14,86 \pm 0,34$ p. 100 d'azote, taux qui correspond bien à celui que l'on trouve généralement dans les protéines.

Nous avons déterminé le spectre d'absorption dans l'ultraviolet de cette fraction après l'avoir reprise soit par la soude 0,1 N, soit par une solution de chlorure de sodium à 8 g. par litre. A cette fin, le précipité de protéines est isolé à partir de 10 ml d'extrait par addition de 90 ml d'éthanol à $+4^{\circ}\text{C}$, puis par centrifugation à basse température (de 0 à $+4^{\circ}\text{C}$). Le culot est lavé à 2 reprises avec 10 ml d'alcool à 90 p. 100 et séché sous vide phosphorique.

Dans le premier cas, il est dissout dans 10 ml de soude 0,1 N. Une partie aliquote de la solution (0,4 ml) est additionnée de 0,4 ml de solution de chlorure de sodium à 8 g/l et complété à 20 ml avec de l'eau distillée (solution A).

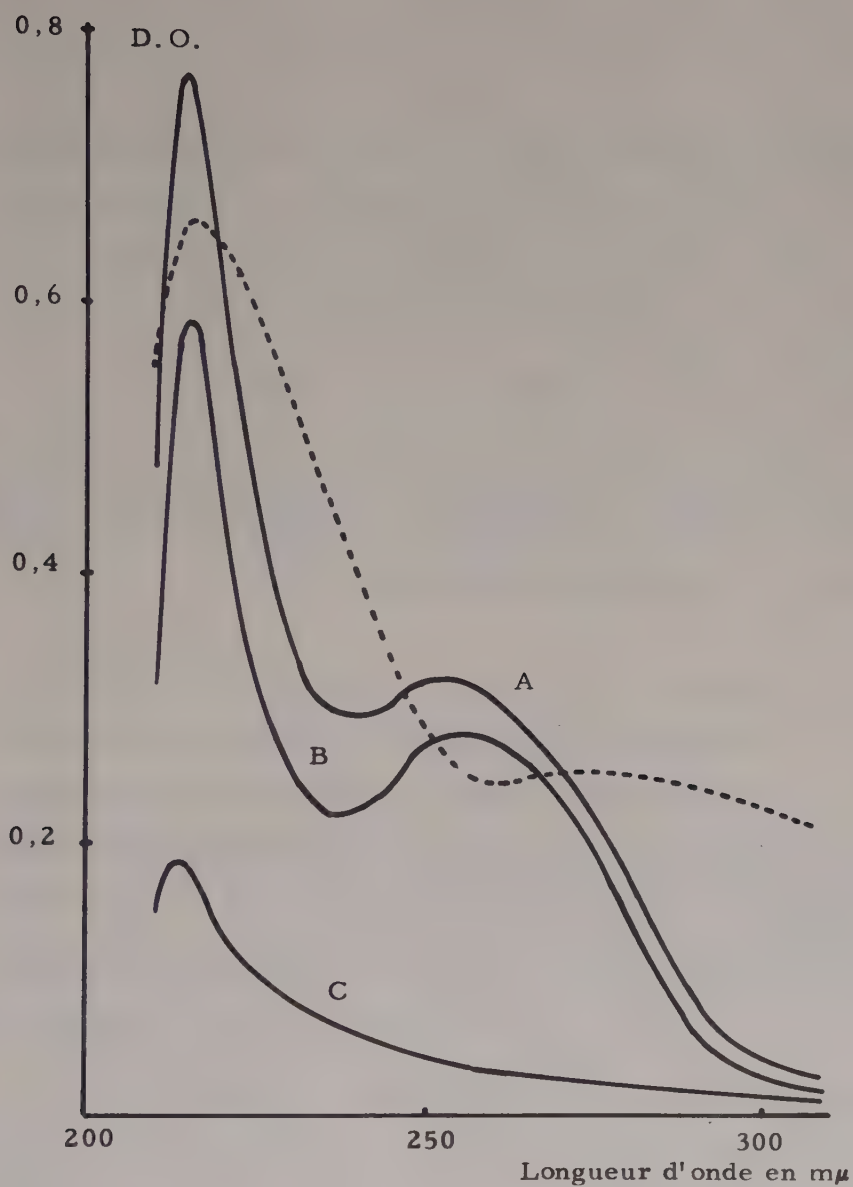
Dans le second cas, le culot de centrifugation est repris par 10 ml de solution de chlorure de sodium à 8 g par litre et la suspension est agitée pendant une heure environ. Une partie du précipité ne se solubilise pas ; elle est séparée par centrifugation. Une fraction aliquote (0,4 ml) de la solution surnageante est additionnée de 0,4 ml de soude 0,1 N et le volume est complété à 20 ml avec de l'eau distillée (solution B).

Le résidu insoluble dans la solution de chlorure de sodium est dissout dans 10 ml de soude 0,1 N. A 0,4 ml de cette solution, on ajoute 0,4 ml de solution de chlorure de sodium à 8 g par litre puis de l'eau distillée jusqu'à un volume de 20 ml (solution C).

En opérant de cette façon, on prépare des solutions de protéines de même pH et de même force ionique, ce qui permet d'éliminer l'influence de ces facteurs sur les spectres d'absorption.

Les spectres sont enregistrés entre 210 et 320 $\text{m}\mu$ par rapport à un essai à blanc obtenu dans les mêmes conditions.

Les spectres sont indiqués sur la figure n° 7. Ils présentent tous



- Figure n° 7

Spectres d'absorption dans l'ultra-violet
 Solution A - Solution B - Solution C
 ----- Bilirubine

un maximum d'absorption à $214 \text{ m}\mu$. Le spectre de la solution A présente, en outre, un second maximum d'absorption à $255 \text{ m}\mu$ que l'on retrouve sur le spectre de la solution B, mais qui n'existe plus sur le spectre de la solution C. Ce second maximum est donc caractéristique de la fraction protéique soluble dans le chlorure de sodium à 8 g. par litre.

Il faut noter l'absence de maximum d'absorption au voisinage de $278 \text{ m}\mu$, maximum toujours présent sur les spectres des protéines qui renferment des acides aminés aromatiques.

L'absorption intense à $214 \text{ m}\mu$ pouvait être attribuée à la présence de pigments biliaires liés aux protéines ou simplement entraînés par elles lors de la précipitation. En effet, le spectre de la bilirubine en solution dans le même milieu présente un maximum à $215 \text{ m}\mu$. Mais le rapport $\frac{D_{300}}{D_{214}}$ des densités optiques mesurées à 300 et $214 \text{ m}\mu$ est de 0,34 pour la bilirubine et seulement de 0,05 pour la fraction soluble dans le surnatant de chlorure de sodium. Donc, si les pigments biliaires participent à l'absorption à $214 \text{ m}\mu$, c'est seulement dans une proportion qui peut être tenue pour insignifiante.

QUATRIEME PARTIE

ETUDE DE L'ACTION PROTECTRICE DES DIFFERENTES FRACTIONS CONTRE L'ACTION CANCEROGENE DU BENZO 3,4-PYRENE

Dans toute étude relative à la protection contre des agents cancérogènes chimiques, l'expérimentation biologique doit porter sur un grand nombre d'animaux et se prolonger pendant près d'une année. Par suite de ces difficultés d'ordre pratique, nous avons dû nous limiter à l'essai de deux fractions, ce qui nous a conduit à pratiquer une sélection.

Si l'on considère les divers groupes de constituants qui entrent dans la composition de l'extrait vésiculaire total, on remarque que trois d'entre eux seulement s'y trouvent en quantité suffisante pour être susceptibles d'exercer une action biologique : les sels biliaires, la fraction lipidique et la fraction protéique.

Les sels biliaires constituent la majeure partie du résidu sec de l'extrait. Leur pouvoir protecteur contre les hydrocarbures cancérogènes ne semble pas avoir été étudié ; en revanche, il a été montré que certains d'entre eux, en particulier l'acide désoxycholique, possèdent une action cancérogène chez l'animal (69). D'autre part, certains auteurs sont parve-

nus à réaliser in vitro la synthèse du 20-méthylcholantrène, hydrocarbure doué d'un pouvoir cancérogène intense, à partir de l'acide cholique ou de l'acide désoxycholique (126) (24). Dans ces conditions, il paraît peu vraisemblable que les sels biliaires puissent exercer un effet protecteur contre l'action cancérogène du benzo 3,4-pyrène. L'expérimentation de cette fraction, pourtant quantitativement importante, ne s'avérerait donc pas nécessaire.

I - ESSAI D'UNE FRACTION LIPIDIQUE. (FRACTION F)

L'extrait ne renferme qu'une partie des lipides présents dans la vésicule, ceux qui sont hydrosolubles ou solubilisés à la faveur de la présence des sels biliaires. Il nous a donc paru plus rationnel de ne pas expérimenter seulement les lipides dissous dans l'extrait aqueux, mais tous ceux présents dans la vésicule.

1 - MODE DE PREPARATION :

Pour préparer un extrait lipidique total de vésicule biliaire, nous avons dû mettre au point un procédé d'isolement qui soit spécialement adapté à cet organe riche en sels biliaires.

Les lipides sont extraits à partir de vésicules fraîches, déshydratées par lyophilisation. Environ cent vésicules sont utilisées pour chaque préparation. Elles sont épuisées par un mélange éthéro-alcoolique au tiers (v/v). Après filtration, la solution est additionnée d'un excès d'éther pour précipiter la majeure partie des sels biliaires qui sont recueillis sur filtre Buchner. La solution, concentrée sous pression réduite et à la température ambiante, laisse un résidu, qui est repris par l'éther de pétrole bidistillé. L'évaporation de la solution éthérée, sous pression réduite et à la température ambiante, permet d'obtenir une masse d'aspect butyreux et de teinte légèrement rosée. Sous cette forme, la fraction lipidique n'est pas assez fluide pour qu'il soit possible de l'utiliser par voie parentérale. Nous avons dû la diluer au demi dans de l'huile d'olive neutralisée et stérilisée.

2 - PROTOCOLE D'EXPERIMENTATION SUR LA SOURIS :

Les essais ont été conduits suivant le protocole déjà indiqué à propos de l'expérimentation de l'extrait total de vésicule biliaire, mais en utilisant une solution un peu moins concentrée en benzo 3, 4-pyrène, afin de réduire la mortalité par intoxication générale.

Deux lots homogènes de 50 souris de race SWISS reçoivent, deux fois par semaine, durant trois mois, une application d'une solution acétonique de benzo 3, 4-pyrène à 200 mg pour 100 ml.

Un lot (lot témoin) n'est soumis à aucun autre traitement. Le second lot (lot traité) reçoit 3 injections par semaine de 0,2 ml de la solution lipidique, soit 0,1 ml de lipides vésiculaires.

3 - RESULTATS :

Les résultats de cette expérimentation sont indiqués dans les tableaux n° 9 et n° 10 et représentés sur la figure n° 8.

LOT TEMOIN

Temps écoulé -Jours -	Nombre de souris cancérisées n_1	Nombre de souris non cancérisées vivantes n_2	Total $n_1 + n_2$	Pourcentage de souris cancérisées $\frac{n_1}{n_1 + n_2} \times 100$
90	3	28	31	9,6
120	11	20	31	35,5
150	16	15	31	51,6
180	17	13	30	56,7
210	18	12	30	60,0
240	19	10	29	65,5
270	25	4	29	86,2
300	25	4	29	86,2
330	27	0	27	100
360	27	0	27	100

TABLEAU n° 9

LOT TRAITE (FRACTION F)

Temps écoulé -Jours-	Nombre de souris cancérisées n_1	Nombre de souris non cancérisées vivantes n_2	Total $n_1 + n_2$	Pourcentage de souris cancérisées $\frac{n_1}{n_1 + n_2} \times 100$
90	2	26	28	7,1
120	4	19	23	17,4
150	10	10	20	50,0
180	11	5	16	68,7
210	11	2	13	84,6
240	12	1	13	92,3
270	12	1	13	92,3
300	12	0	12	100

TABEAU n° 10

Il n'existe pas de différence significative entre les pourcentages d'animaux cancérisés dans le lot témoin et dans le lot traité. Ces résultats indiquent donc que la fraction lipidique est dépourvue d'effet protecteur contre l'action cancérogène du benzo 3,4-pyrène. Bien plus, il semblerait que l'injection de lipides augmente légèrement le pourcentage de souris cancérisées. Ce phénomène pourrait s'expliquer par une activité cancérogène propre aux stéroïdes biliaires présents dans la fraction lipidique. Une telle activité a été démontrée par BURGER et UIKER (17).

II - ESSAI DE LA FRACTION PROTEIQUE (FRACTION E).

Désirant recueillir des protéines destinées à une expérimentation biologique, nous devons chercher à les isoler en les dénaturant le moins possible.

Nous avons eu recours à la précipitation alcoolique à froid, procédé considéré comme donnant les meilleures garanties dans ce domaine. L'emploi de l'éthanol présente, en outre, un avantage intéressant : il est

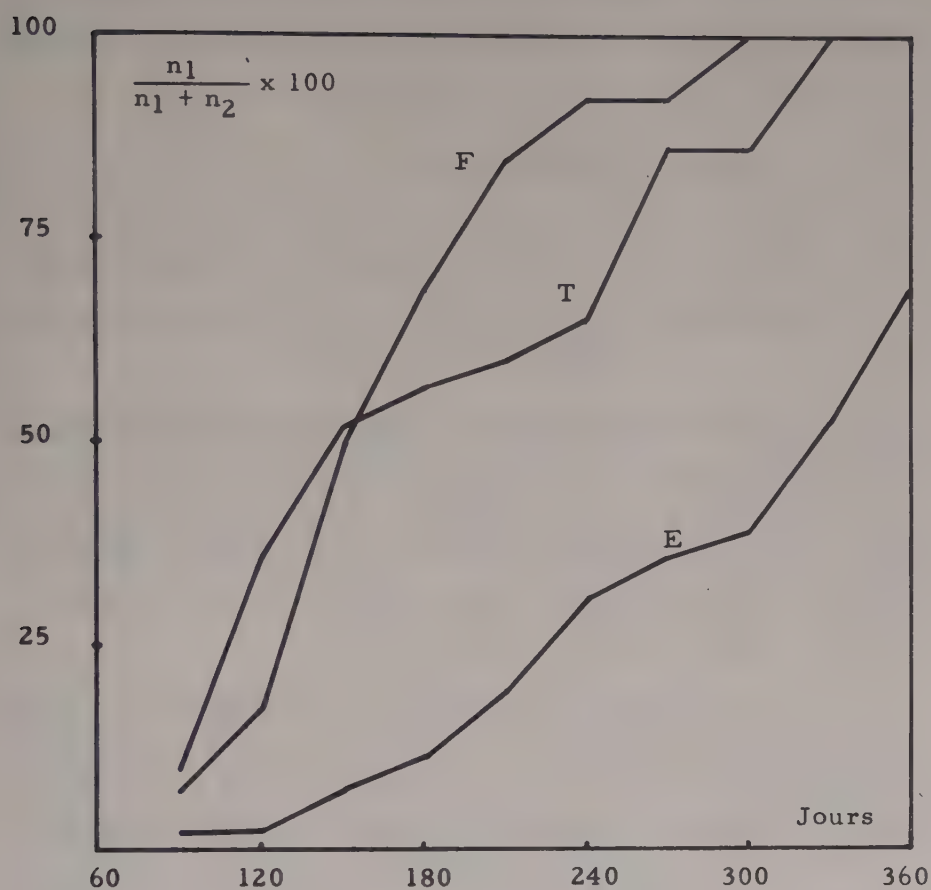


Figure n° 8

Pourcentage de souris cancérisées

T : lot témoin

E : lot traité avec la fraction protéique

F : lot traité avec la fraction lipidique

aisé d'éliminer par évaporation la petite quantité de solvant qui imprègne le précipité et, de toute façon, la présence de traces d'éthanol ne peut conférer aucune toxicité à la solution injectable.

1 - MODE DE PREPARATION :

200 ml d'extrait refroidi à $+ 4^{\circ}\text{C}$ sont versés lentement et en agitant continuellement dans 1,800 litre d'éthanol pur, également refroidi à $+ 4^{\circ}\text{C}$. Le précipité est recueilli par centrifugation en centrifugeuse réfrigérée.

Le culot est ensuite exposé à un courant d'azote, pendant quelques minutes afin d'éliminer le peu d'alcool qu'il retient. Il est alors repris par du soluté de chlorure de sodium à 8 g/l, employé par fractions de 50 ml jusqu'à obtention d'un volume total de 200 ml. Lors de chaque extraction, la suspension est agitée pendant 10 mn environ pour réaliser une dissolution aussi complète que possible des protéines.

La partie insoluble est éliminée par centrifugation. Le liquide clair recueilli est additionné de merthiolate de sodium à la concentration de 1/20000, soumis à une filtration stérile sur bougie et mis en ampoules stériles. Les ampoules de soluté injectable sont conservées au réfrigérateur à $+ 4^{\circ}\text{C}$. Ce mode de préparation permet d'obtenir une solution dont 1 ml contient les protéines solubles dans le soluté de chlorure de sodium à 8 g/l, qui sont présentes dans 1 ml d'extrait total.

2 - PROTOCOLE D'EXPERIMENTATION SUR LA SOURIS :

Ce protocole est identique à celui que nous avons décrit à propos de l'expérimentation de la fraction lipidique. Seule la nature du produit injecté est différente. Dans le cas présent, les animaux du lot traité reçoivent trois fois par semaine une injection de 0,3 ml de la fraction protéique.

3 - RESULTATS :

Les résultats indiqués dans les tableaux n° 9, 11 et 12 et repré-

sentés sur la figure n° 8 font ressortir une différence très nette entre la fréquence des souris cancérisées dans le lot témoin et dans le lot traité.

Du point de vue statistique, cette différence est hautement significative depuis le quatrième mois, qui suit le début de l'expérience, jusqu'à la fin du douzième mois, moment à partir duquel la poursuite de l'expérience n'a plus de signification, puisque les souris de de cette race ont une durée de vie moyenne de 14 mois.

LOT TRAITE (FRACTION E)

Temps écoulé -Jours-	Nombre de souris cancérisées n_1	Nombre de souris non cancérisées vivantes n_2	Total $n_1 + n_2$	Pourcentage de souris cancérisées $\frac{n_1}{n_1 + n_2} \times 100$
90	1	42	43	2,3
120	1	41	42	2,4
150	3	37	40	7,5
180	4	31	35	11,4
210	6	25	31	19,4
240	8	18	26	30,8
270	9	16	25	36,0
300	9	14	23	39,1
330	10	9	19	52,6
360	11	5	16	68,7

TABLEAU n° 11

Temps écoulé depuis le début des badigeonnages - Jours -	Pourcentage de souris cancérisées		χ^2_c
	Lot témoin	Lot traité (Fraction E)	
90	9,6	2,3	0,74
120	35,5	2,4	11,92
150	51,6	7,5	15,16
180	56,7	11,4	13,12
210	60,0	19,4	8,92
240	65,5	30,8	5,30
270	86,2	36,0	12,44
300	86,2	39,1	10,57
330	100	52,6	13,03
360	100	68,7	6,75

χ^2_c 0,05 pour un degré de liberté = 3,84
 χ^2_c 0,01 pour un degré de liberté = 6,64
 χ^2_c 0,001 pour un degré de liberté = 10,83

TABLEAU n° 12

Dans cette expérience, les animaux ont été badigeonnés avec une solution de benzo 3,4-pyrène moins concentrée que celle qui avait été utilisée pour l'expérimentation de l'extrait total. Cela semble avoir eu deux conséquences :

- une légère réduction de la mortalité due à la toxicité générale de l'hydrocarbure cancérigène ; en effet, à la fin de la période d'application du benzo 3,4-pyrène, il reste 31 souris dans le lot témoin et 42 dans le lot traité ; à ce sujet, nous devons signaler que cette différence n'est pas significative du point de vue statistique et ne permet pas d'attribuer au produit expérimenté une action antitoxique ;

- un ralentissement du processus de cancérisation qui apparaît nettement quand on compare les lots témoins des deux expériences (figure n° 9).

En outre, la protection contre l'action cancérigène ne se manifeste pas de la même façon dans les deux expériences : la protection assurée par l'extrait total est significative du troisième au septième mois qui suivent le début de l'expérience ; avec la fraction protéique, la protection ne devient significative qu'au quatrième mois, mais elle se prolonge jusqu'à la fin du douzième mois, terme de l'expérience. Cette constatation tendrait à laisser croire que la fraction protéique est plus active que l'extrait total. Mais il faut tenir compte du fait que l'action protectrice s'exerce dans des conditions différentes par suite de l'emploi d'une solution de benzo 3,4-pyrène moins concentrée. Il est possible en effet que le retard et l'étalement dans le temps de la cancérisation favorisent l'effet de l'agent protecteur.

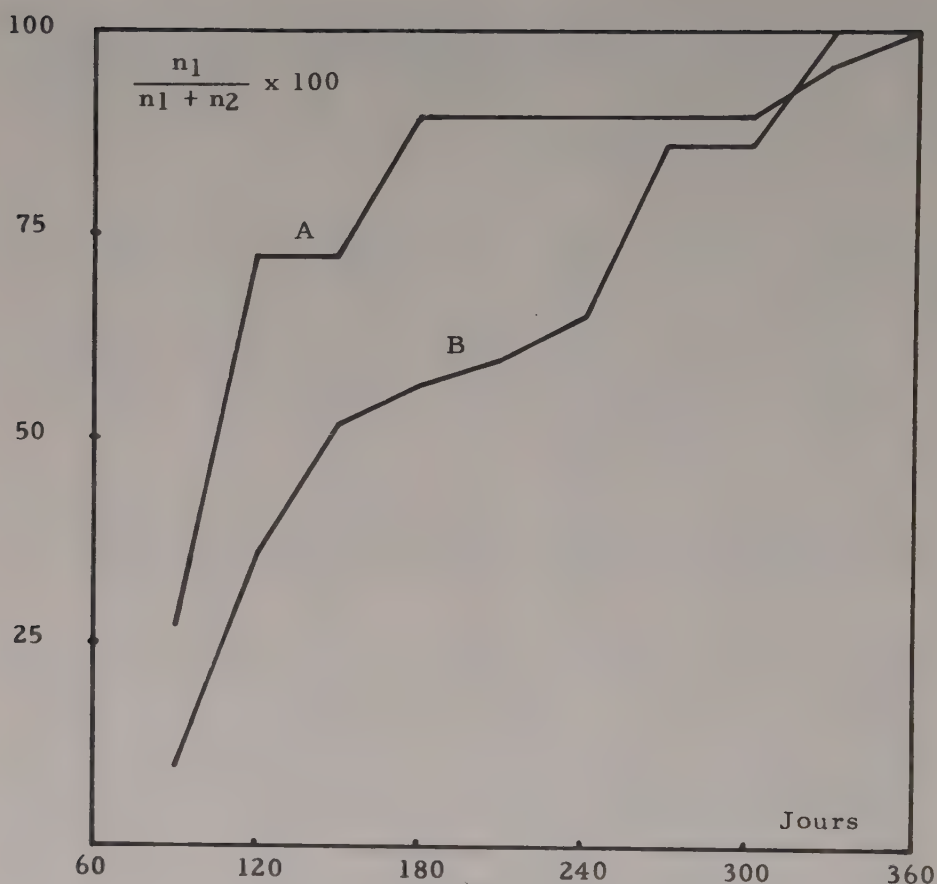


Figure n° 9

Pourcentage de souris cancérisées dans les lots témoins

A : avec une solution de benzo 3,4-pyrène à 0,5 p. 100

B : avec une solution de benzo 3,4-pyrène à 0,2 p. 100

CINQUIEME PARTIE

ETUDE ANALYTIQUE DE LA FRACTION PROTEIQUE BIOLOGIQUEMENT ACTIVE (FRACTION E)

Au cours de l'expérience qui précède, nous avons établi que la fraction protéique isolée de l'extrait aqueux total de vésicule biliaire et que nous nommerons désormais fraction E, exerce, comme lui, une action protectrice contre la cancérisation induite par le benzo 3, 4-pyrène.

Dès lors, notre travail a consisté à préparer un nouveau stade de l'expérimentation biologique en cherchant à séparer les divers constituants de cette fraction protéique.

Mais, au préalable, nous devions vérifier l'hétérogénéité de cette fraction.

Pour établir qu'une protéine est homogène, il faut utiliser au moins deux tests. Un test est considéré comme très précis, celui de la solubilité, mais nous avons dû l'écarter, car il nécessite une quantité de protéines plus importante que celle dont nous pouvions disposer. En outre, il n'est applicable qu'aux protéines qui présentent déjà un certain degré de pureté. Comme autres tests, nous pouvions disposer de l'électrophorèse et de l'ultracentrifugation. Nous avons commencé par l'étude électrophorétique,

qui demande des moyens matériels moins importants que l'ultracentrifugation, réservant cette seconde méthode pour confirmer les résultats fournis par l'électrophorèse.

I - ETUDE ELECTROPHORETIQUE.

La principale qualité d'une méthode d'électrophorèse réside dans son pouvoir de résolution. A l'heure actuelle, celle qui est considérée comme possédant au mieux cette qualité est la méthode qui utilise des colonnes de polyacrylamide, dite de "disc electrophoresis", et préconisée par ORNSTEIN (79) et DAVIS (32).

Grâce à cette méthode, appliquée selon la technique de R. MONNET, P. MORE, J. POISBEAU et M. Th. MORE (76), nous avons pu mettre en évidence dans la fraction E, l'existence de cinq constituants.

1 - PREPARATION DE L'ECHANTILLON :

Comme la présence d'un trop grand volume de liquide risque d'entraver la polymérisation du "sample gel", il est prudent d'opérer avec un échantillon de volume réduit de l'ordre de 20 μ l. Dans ces conditions, pour que la quantité de protéines soumise à l'électrophorèse soit suffisante, il faut opérer sur une solution concentrée, ce qui n'est pas le cas de la fraction E dont la teneur en protéines est voisine de 1,3 mg/ml.

Concentrer cette fraction présentait l'inconvénient d'augmenter sa teneur en chlorure de sodium et par suite le risque de relarguer une partie des protéines. Il nous a donc paru préférable de préparer directement une solution plus concentrée en reprenant le précipité de protéines par un volume cinq fois moindre de solution de chlorure de sodium.

Suivant le procédé que nous avons déjà appliqué, nous avons précipité les protéines de 50 ml d'extract aqueux total, puis nous avons dissout le culot de centrifugation dans 10 ml de solution de chlorure de sodium à 8 g. par litre.

Afin de vérifier que la solution obtenue était bien cinq fois plus concentrée en protéines que la fraction E préparée à partir du même extrait, nous avons effectué un dosage selon la technique de GORNALL qui nous a donné les résultats suivants :

Fraction E	1,24 mg/ml
Solution concentrée	5,84 mg/ml

La proportion de protéines dissoutes dans la solution concentrée est inférieure de 6 p. 100 à celle qui existerait dans la fraction E si celle-ci avait été concentrée cinq fois par évaporation ($5 \times 1,24 = 6,20$ mg/ml). Cette différence peut être tenue pour négligeable, d'autant plus que nous nous proposons d'effectuer seulement une électrophorèse qualitative.

2 - PREPARATION DES COLONNES :

A) Solutions stock :

a) Accélérateur (1) :

HC1 N	48 ml
2 amino - 2 hydroxyméthyl 1-3 propane diol (TRIS)	5,98 g
N.N.N'N' tétraméthyl éthylène diamine (TEMED)	0,46 ml
Eau distillée	q. s. p. 100 ml

b) Accélérateur (2) :

HC1 N	48 ml
TRIS	36,3 g
TEMED	0,23 ml
Eau distillée	q. s. p. 100 ml

c) Monomère (1) :

Acrylamide		10 g
N, N' méthylène bis-acrylamide (BIS)		2, 5 g
Eau distillée	q. s. p.	100 ml

d) Monomère (2) :

Acrylamide		28 g
BIS		0, 735 g
Eau distillée	q. s. p.	100 ml

e) Saccharose (1) :

Saccharose		53, 3 g
Eau distillée	q. s. p.	100 ml

f) Saccharose (2) :

Saccharose		40 g
Eau distillée	q. s. p.	100 ml

g) Catalyseur (1) :

Riboflavine		4 mg
Eau distillée	q. s. p.	100 ml

h) Catalyseur (2) :

Persulfate d'ammonium		0, 14 g
Eau distillée	q. s. p.	100

B) Mode opératoire :

Nous avons préparé simultanément trois colonnes avec l'échantillon de protéines.

a) Préparation du "sample gel" :

Dans un tube de verre (65 x 5 mm), on introduit 0,5 ml du mélange suivant préparé extemporanément :

solution a	1 ml
solution c	2 ml
solution g	1 ml
solution e	3 ml

puis on ajoute dans le tube 20 μ l de l'échantillon de protéines à analyser et on mélange avec soin. Au dessus du gel, on dépose avec précaution une goutte d'eau de façon à éviter la formation d'un ménisque et à obtenir une surface de séparation bien plane. La photopolymérisation s'effectue sous lampe fluorescente pendant 30 mn.

b) Préparation du "stacking gel" :

On recouvre la partie supérieure de la colonne de "sample gel" d'une couche d'1 cm de hauteur du mélange suivant préparé extemporanément :

solution a	1 ml
solution c	2 ml
solution g	1 ml
solution f	4 ml

on ajoute un peu d'eau sur la couche de "stacking gel" de façon à éviter la formation d'un ménisque, comme il a été fait pour la préparation du "sample gel".

La polymérisation est réalisée en 30 mn sous la lampe fluorescente.

c) Préparation du "Separating gel" :

On remplit le tube en déposant à la surface du "stacking gel", la solution obtenue par addition à parties égales de la solution h et du mélange suivant préparé extemporanément :

solution b	1 ml
solution d	2 ml
eau distillée	1 ml

La polymérisation doit être effectuée à l'abri de l'air et de la lumière pendant 30 mn.

3 - ELECTROPHORESE :

La cellule d'électrophorèse est composée de deux bacs circulaires, placés l'un au dessus de l'autre sur un support. Le fond du bac supérieur est percé d'orifices bordés de joints souples qui peuvent être obturés avec des bouchons de caoutchouc.

La solution tampon de pH = 8,2 - 8,4 et de force ionique égale à 0,1 est introduite dans les bacs ; elle a la composition suivante :

glycine	14,4 g
TRIS	3 g
eau distillée	q. s. p.
	1 l

Les tubes de gel sont insérés dans les orifices du bac supérieur, de telle manière que le "sample gel" se trouve placé vers le haut. L'extrémité inférieure des tubes plonge légèrement dans le tampon contenu dans le second bac.

Les électrodes (pôle + dans le bac inférieur) sont reliés à un générateur de courant d'intensité constante (2,5 mA par colonne).

L'électrophorèse est poursuivie pendant 70 mn.

4 - REVELATION :

Les gels sont extraits des tubes, puis immergés pendant 75 mn dans une solution d'aniline Blue Black à 0,5 p.100 dans l'acide acétique dilué à 7 p.100. Ensuite, ils sont introduits dans des tubes d'un diamètre légèrement supérieur au leur et dont l'extrémité inférieure est obturée par un peu de gel de polyacrylamide.

L'excès de colorant est éliminé par une décoloration électrophorétique, dans le même appareil, en remplaçant le tampon par une solution d'acide acétique à 7 p.100. L'opération est effectuée durant une heure et sous un courant de 12 mA par colonne.

Les colonnes sont ensuite conservées dans la solution d'acide acétique.

5 - RESULTATS :

L'électrophorègramme qui est reproduit sur la figure n° 10 présente cinq bandes. Par ordre de mobilité électrophorétique croissante, on distingue :

- une zone diffuse, peu intense qui migre faiblement ;
- une bande large également peu intense ;
- deux bandes fines, voisines l'une de l'autre mais nettement séparées ;
- une bande très intense, nettement délimitée.

Par conséquent, la fraction E comprend au moins cinq composants.

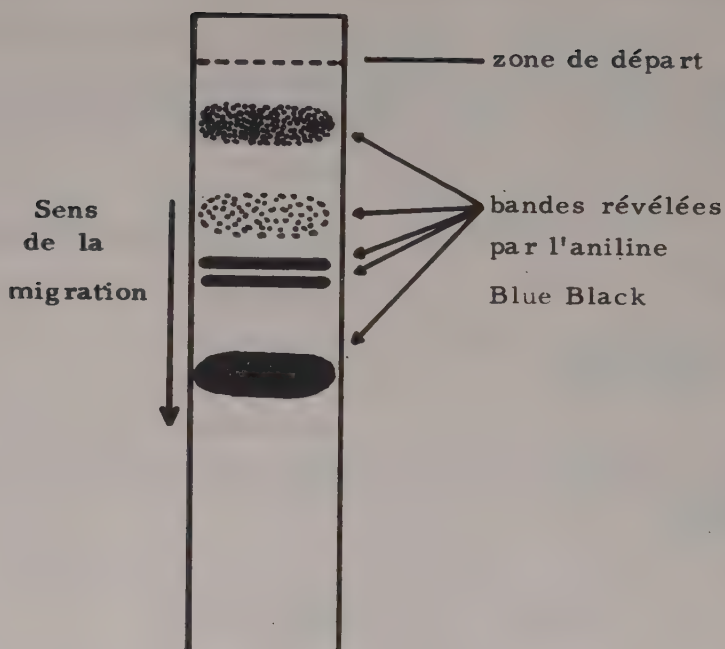


Figure n° 10

Electrophorégramme de la fraction E

II - FRACTIONNEMENT SUR SEPHADEX.

Depuis 1959 (87), les "Sephadex" ont reçu un très grand nombre d'applications dans le domaine du fractionnement des peptides et des protéines. Sous ce nom commercial, on désigne des polymères glucidiques, non ioniques, préparés à partir de dextrans modifiés par la création de liaisons croisées, de manière à réaliser un réseau tridimensionnel de chaînes polyosidiques.

Lorsqu'une solution traverse une colonne de ce gel, il se produit un véritable "tamisage moléculaire" des substances dissoutes, en fonction de leur encombrement stérique et par conséquent de leur poids moléculaire. Comme il s'agit d'un phénomène uniquement physique, la séparation s'effectue avec le minimum d'altération des protéines.

Il existe différents types de Sephadex, dont les limites d'exclusion exprimées en poids moléculaires, s'échelonnent de 3500 à 200 000. Pour le fractionnement des polypeptides et des protéines, les deux types de gel les plus couramment utilisés sont les G 100 et G 200, dont les limites d'exclusion correspondent respectivement à des poids moléculaires de l'ordre de 100 000 et 200 000.

Cette méthode de fractionnement relativement simple à mettre en oeuvre nous a paru convenir à la séparation des constituants de la fraction E.

1 - MONTAGE EXPERIMENTAL :

Le montage dont nous nous sommes servi est représenté sur la figure n° 11. Il comprend :

- la colonne de gel contenue dans un tube de verre (450 x 25 mm), fermé à chacune de ses extrémités par des bouchons de chlorure de polyvinyle portant des tubulures de 1,2 mm de diamètre.

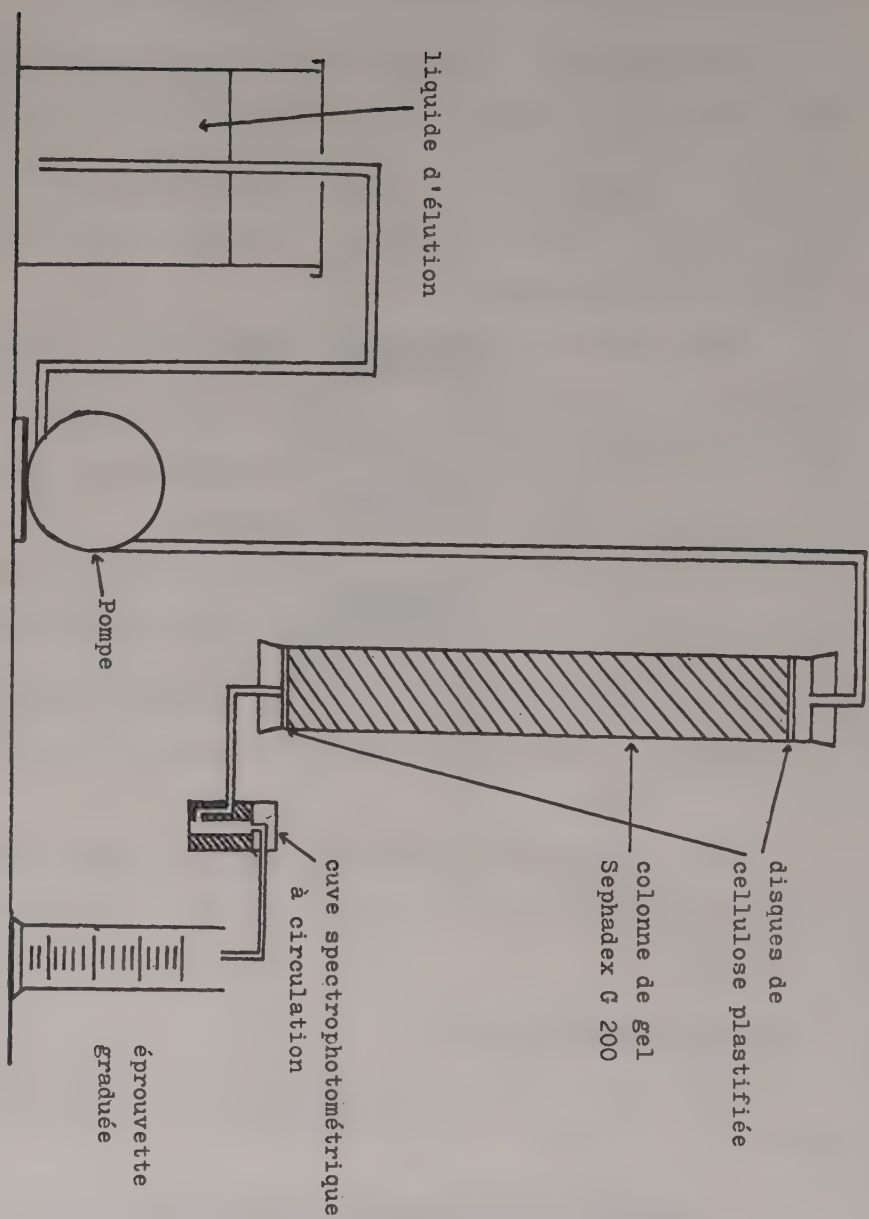


Figure n°11

- une pompe électrique à débit réglable qui approvisionne la colonne en liquide d'élution. La sortie de la colonne est reliée à une cuve à circulation en quartz, placée à l'intérieur d'un spectrophotomètre enregistreur (Spectralux - SAFAS) ; l'éluat circule dans la cuve en pénétrant par sa base et en sortant par sa partie supérieure ; ce mode de remplissage et le faible volume utile (1 ml) évite la turbulence du liquide, quand son débit est suffisamment lent. A la sortie de la cuve, l'éluat est recueilli dans une éprouvette graduée, ce qui permet de mesurer les volumes en fonction du temps et de contrôler le débit réel.

2 - MODE OPERATOIRE :

A) Préparation du gel et remplissage de la colonne :

10 g de Sephadex (G 200) sont versés lentement dans environ 800 ml d'eau distillée soumis à une agitation continue pour éviter la formation d'agréats. Après une heure d'agitation, on laisse le gel sédimenter et on élimine les fines particules surnageantes par décantation. Cette opération est renouvelée deux fois, puis on laisse le gel s'équilibrer, pendant 24 heures, contre l'eau distillée.

On dépose un disque de cellulose plastifiée sur le fond de la colonne et on procède au remplissage de cette dernière avec le gel équilibré, en veillant à éviter la formation de bulles d'air. La surface du gel est recouverte par un second disque de cellulose plastifiée placé bien horizontalement.

La colonne est ensuite lavée pendant plusieurs heures avec de l'eau distillée sous un débit voisin de 2 ml/mn.

B) Dépôt de l'échantillon et élution :

Prévoyant qu'il serait nécessaire de concentrer les éluats pour revenir aux conditions de concentration initiale, nous avons cherché à préparer une solution de fraction E dans l'eau distillée et non plus dans une

solution de chlorure de sodium. En effet, la présence du chlorure de sodium aurait compliqué les opérations au moment de la concentration en nécessitant l'intervention d'une dialyse.

Nous avons donc préparé une solution aqueuse en reprenant par 5 ml d'eau distillée les protéines isolées par précipitation alcoolique de 25 ml d'extrait aqueux total. Nous avons vérifié que cette solution présente des caractères identiques à ceux d'une solution obtenue en reprenant par 5 ml d'une solution de chlorure de sodium à 8 p. 100, le culot de centrifugation isolé de la même manière, à partir de 25 ml du même extrait. Nous avons trouvé que les deux solutions renferment bien la même concentration d'azote total, de phosphore total et de protéines dosées selon la méthode de GORNALL.

1 ml de cette solution aqueuse est déposée au sommet de la colonne de SEPHADEX.

L'élution est réalisée avec de l'eau distillée sous un débit de 30 ml/h.

Le fractionnement est suivi en enregistrant la densité optique de l'éluat à la longueur d'onde de $255\text{ m}\mu$, qui correspond à l'un des maximum d'absorption de la solution de protéines. La chromatographie est poursuivie pendant 16 heures, temps pendant lequel 480 ml d'éluant, soit plus de deux fois le volume total de la colonne, passent sur le gel.

3 - RESULTATS :

Le diagramme d'élution reproduit sur la figure n° 12 présente deux pics :

- un premier pic de faible importance, apparaît entre le 60è et le 70è ml d'éluat avec une intensité maximum au 65è ml ;
- le second, très important, subit une rétention plus prolongée. Il apparaît entre le 180è ml et le 250è ml d'éluat , avec une inten-

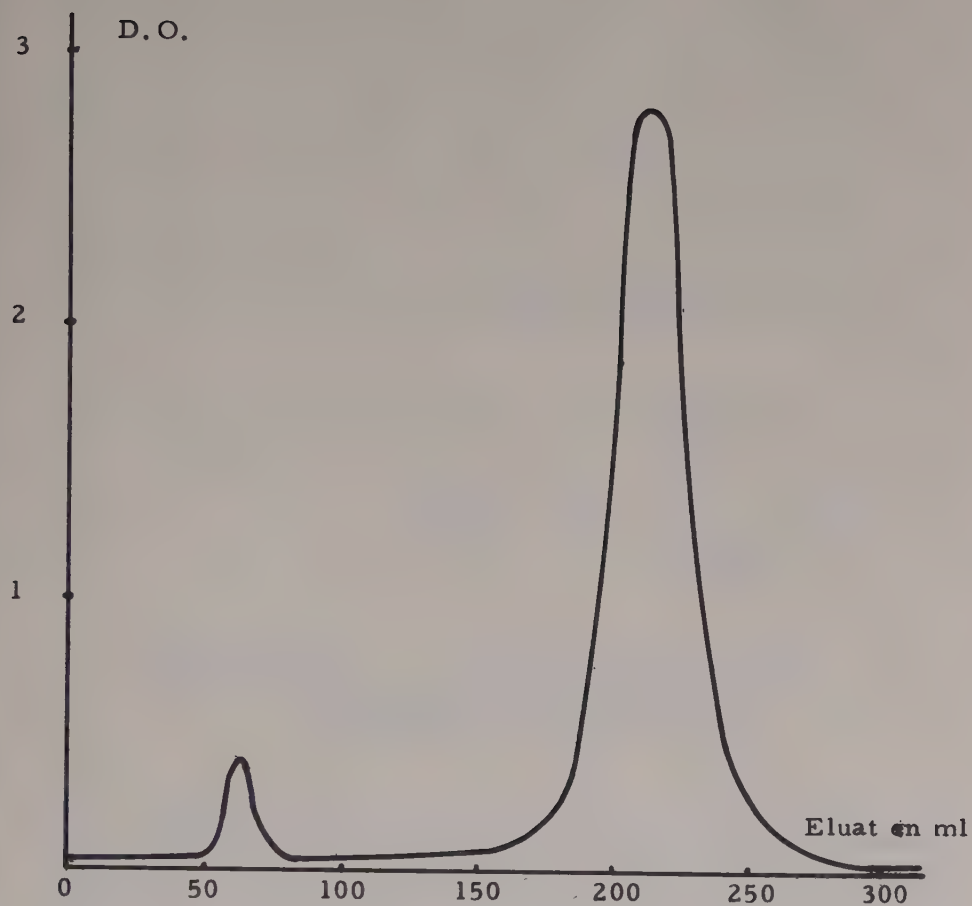


Figure n° 12

Diagramme d'élution de la fraction E
sur gel de Sephadex

sité maximum au 210^è ml. Le volume total occupé par le gel étant de 225 ml, le volume de liquide extérieur au gel G 200 est de 67 ml et le volume intérieur de 150 ml. La fraction F_1 , dont le maximum d'intensité apparaît au 65^è ml contient des substances dont les poids moléculaires sont au moins égaux à 200 000, car elles sont totalement exclues du gel. Par contre, la fraction F_2 n'apparaît qu'après 210 ml d'éluat : les produits qu'elle contient sont donc totalement inclus dans le gel et par conséquent leurs poids moléculaires doivent être inférieurs à 200 000.

La chromatographie sur colonne de SEPHADEX G 200 permet donc de séparer les constituants de la fraction E en deux groupes :

- une fraction E_1 , éluee la première
- une fraction E_2 .

III - ANALYSE DES FRACTIONS E_1 ET E_2 OBTENUES PAR FRACTIONNEMENT SUR SEPHADEX.

Les quantités de produits obtenues de cette manière étant insuffisantes pour qu'il soit possible de procéder à l'analyse complète de chacun d'eux, nous avons repris ce fractionnement en opérant sur un volume beaucoup plus important de solution et en utilisant une colonne de plus grandes dimensions (60 mm de diamètre et 400 mm de longueur) qui contient un litre de gel "Sephadex" G 200. Grâce à l'emploi de cette colonne, nous avons pu opérer le fractionnement sur 20 ml de solution aqueuse de la fraction E.

1 - METHODES D'ANALYSE :

A la fin de l'opération, les éluats, correspondant respectivement aux fractions que nous avons appelées E_1 et E_2 sont amenés à des volumes de 200 et 400 ml par addition d'eau distillée.

Sur ces éluats nous avons procédé aux déterminations suivantes :

A) Résidu sec :

Une prise d'essai d'éluat (50 ml) est évaporée à sec dans un cristalliseur taré, à l'étuve à 105°.

B) Azote total :

20 ml d'éluat sont évaporés dans un matras de KJELDAHL à 115° et l'azote est dosé sur le résidu d'évaporation selon la technique indiquée à la page 56.

C) Phosphore total :

10 ml d'éluat sont évaporés à l'étuve à 115° et le phosphore est dosé dans le résidu selon la technique indiquée à la page 58.

D) Soufre total :

20 ml d'éluat sont évaporés à sec à l'étuve à 115° et le soufre est dosé dans le résidu selon la technique indiquée à la page 57.

E) Oses :

Les oses sont dosés par la méthode à l'orcinol en milieu sulfurique, selon la technique indiquée par VASSEUR (113). Une fraction aliquote de chaque éluat (0,2 ml de l'éluat E_1 et 1 ml de l'éluat E_2) est diluée à 2 ml avec de l'eau distillée et refroidie dans l'eau glacée. On ajoute 3 ml de réactif à l'orcinol (solution à 1 p.100 - p/v dans l'acide sulfurique à 20 p.100 - v/v) puis 10 ml d'une solution d'acide sulfurique à 70 p.100 - v/v. Après agitation, les tubes sont portés au bain-marie à 80° pendant 20 mn et refroidis rapidement dans un bain d'eau glacée. Les densités optiques sont lues à 425 m μ par rapport à un essai à blanc préparé dans les mêmes conditions avec de l'eau distillée. La courbe d'étalonnage est obtenue avec 10, 20, 30 et 40 μ g de galactose. Nous avons choisi cet hexose comme produit de référence, car il est le plus fréquemment rencontré dans les glycoprotéines.

F) Hexosamines :

Pour doser les hexosamines, nous avons utilisé la méthode d'ELSON et MORGAN (35) selon la technique modifiée par BLIX (10). Le principe de cette méthode repose sur la formation d'un produit de condensation coloré entre le paradiméthylaminobenzaldéhyde et un dérivé pyrrolique formé au cours du traitement de l'hexosamine par l'acétylacétone en milieu alcalin.

Une fraction aliquote de chaque éluat (20 ml d'éluat E_1 et 40 ml d'éluat E_2) est concentrée sous vide phosphorique jusqu'à obtention d'un volume de 2 ml. On ajoute 2 ml d'acide chlorhydrique 2 N et on porte au bain-marie bouillant à reflux pendant 15 heures afin de détruire complètement les oses, dont la présence pourrait interférer dans le dosage des hexosamines. Après refroidissement, on neutralise avec de la soude 5 N, puis on ajuste le volume à 5 ml avec de l'eau distillée. On prélève 2 ml de l'hydrolysate auquel on ajoute 2 ml d'une solution d'acétylacétone à 3 p. 100 dans du carbonate de sodium 1,25 N. Le mélange est porté au bain-marie bouillant pendant 20 mn ; on refroidit, puis après addition de 2 ml de réactif d'Erlich (0,8 g de paradiméthylaminobenzaldéhyde dans 30 ml d'un mélange à volume égal d'éthanol et d'acide chlorhydrique pur) le volume est ajusté à 20 ml avec de l'éthanol dilué au demi. Nous avons complété avec de l'éthanol dilué au lieu d'éthanol pur comme le préconise BLIX, afin d'éviter le relargage de chlorure de sodium qui se produit lorsqu'on utilise la technique de BLIX. Le tube bouché est alors porté au bain marie à 37° pendant 30 mn. Après refroidissement, la lecture spectrophotométrique est effectuée à 535 m μ par rapport à un essai à blanc préparé dans les mêmes conditions avec 2 ml d'eau distillée. La courbe d'étalonnage est établie avec 25, 50, 75 et 100 μ g de galactosamine ; nous avons choisi la galactosamine comme référence parce que c'est l'hexosamine qui se rencontre le plus fréquemment et en plus forte proportion dans les glycoprotéines.

G) Réaction de GORNALL :

Une fraction aliquote de l'éluat (20 ml d'éluat E_1 et 40 ml d'éluat E_2) est concentrée sous vide phosphorique jusqu'à un volume de 2 ml. On

ajoute alors 8 ml de réactif de GORNALL et les densités optiques sont lues à $540\text{ m}\mu$ par rapport à un essai à blanc. Ne disposant pas d'une substance étalon, nous ne pouvions pas effectuer de dosage, mais nous avons pu comparer la somme des densités optiques fournies par les éluats E_1 et E_2 à la densité optique de la fraction E mesurée dans les mêmes conditions de concentration et déterminer ainsi le pourcentage des liaisons peptidiques de la fraction E, réparties dans les éluats E_1 et E_2 .

H) Spectre d'absorption dans l'ultra-violet :

Les spectres sont enregistrés entre 200 et $300\text{ m}\mu$, sur des dilutions des éluats dans l'eau distillée, dilution au 1/6 pour l'éluat E_1 et au 1/3 pour l'éluat E_2 .

I) Electrophorèse :

Les éluats sont concentrés par évaporation sous vide phosphorique, afin de les amener dans les mêmes conditions de concentration que la fraction E dont ils proviennent.

L'éluat E_1 est concentré dix fois et l'éluat E_2 vingt fois.

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en tubes est effectuée suivant la technique indiquée à propos de l'analyse de la fraction E.

J) Ultracentrifugation :

Ne disposant pas du matériel nécessaire à cette opération, nous avons demandé à Monsieur le Professeur J. PIERI,* de la Faculté des Sciences de Nantes, de bien vouloir procéder à l'ultracentrifugation des échantillons que nous lui avons confiés.

* auquel nous adressons nos vifs remerciements pour l'aide qu'il a bien voulu nous apporter.

Ces échantillons étaient constitués par les éluats E_1 et E_2 amenés dans les conditions de concentration de la fraction E par évaporation sous vide phosphorique.

2 - RESULTATS ET DISCUSSION :

Les résultats des analyses sont réunis dans les tableaux n° 13 et n° 14.

Leur examen suggère quelques commentaires.

A) Extrait sec :

La somme des extraits secs des fractions E_1 et E_2 (8,01 mg/ml) est légèrement inférieure à l'extrait sec de la fraction E (9,72 mg/ml). Cette perte au cours de la chromatographie provient vraisemblablement du fait qu'une partie des constituants de la fraction E n'absorbe pas les radiations ultra-violettes de 255 m μ de longueur d'onde. Ils échappent ainsi à la détection spectrophotométrique.

B) Oses totaux :

Nous n'avons pas fait figurer dans les tableaux n° 13 et n° 14 les résultats du dosage des oses dans les fractions E_1 et E_2 . En effet, après avoir effectué plusieurs essais, nous avons constaté que la somme des concentrations en oses trouvées dans les fractions E_1 et E_2 dépassait largement la teneur en oses de la fraction E.

La présence d'un tel excès de glucides dans les éluats est due à l'entraînement de produits provenant de l'hydrolyse du gel de SEPHADEX.

Dans ces conditions, les résultats du dosage des oses sont dépourvus de signification.

C) Fraction E_1 :

Du point de vue du résidu sec, cette fraction est de loin la moins

	COMPOSITION en mg/ml		
	Fraction E	Fraction E ₁	Fraction E ₂
Résidu sec	9, 72	0, 39	7, 62
Azote total	1, 13	traces	0, 97
Phosphore total	0, 35	0, 003	0, 32
Soufre total	0, 07	0, 01	0, 07
Oses totaux (en galactose)	0, 17	-	-
Osamines (en galactoramine)	0, 10	traces	0, 08
Réactions de GORNALL	D.O. = 0, 263	D.O. = 0	D.O. = 0, 254
Spectre U.V.	Max à 210 et 255 m μ	Max à 205 m μ	Max à 212 et 255 m μ
Electrophorèse	5 bandes	3 bandes	2 bandes

TABLEAU n° 13

	COMPOSITION DU RESIDU SEC en mg/g		
	Fraction E	Fraction E ₁	Fraction E ₂
Azote total	116	traces	127
Phosphore total	36,0	7,6	42,0
Soufre total	7,2	25,6	9,1
Oses totaux (en galactose)	17,5	-	-
Osamines (en galactosamine)	10,2	traces	10,5

TABLEAU n° 14

importante, puisqu'elle représente seulement la vingt cinquième partie de la fraction E.

Nous avons déjà indiqué que ses constituants ont des poids moléculaires élevés, vraisemblablement supérieurs à 200 000.

Cette fraction renferme de l'azote seulement à l'état de traces, elle n'est donc pas de nature protidique. Cette observation est confirmée par le fait qu'elle ne donne pas la réaction de GORNALL.

Bien que les résultats du dosage des oses soient manifestement entachés d'une erreur par excès, on peut admettre que cette fraction est de nature polysidique.

Elle renferme, en outre, une proportion notable de soufre (2,6 p.100).

Il est donc permis de penser que cette fraction contient les mucopolysaccharides sulfatés que TUSQUES et SENELAR ont mis en évidence dans la vésicule biliaire de mouton par des techniques histochimiques (111).

Cette fraction est formée de trois composants au moins, qui sont mis en évidence par les résultats de l'électrophorèse et de l'ultracentrifugation.

D) Fraction E₂ :

La fraction E₂, la plus importante du point de vue quantitatif, renferme la quasi totalité de l'azote et des substances biurétogènes de la fraction E.

Une partie de ses constituants est donc de nature protidique. D'après leurs volumes de rétention sur gel de SEPHADEX et leurs vitesses de sédimentation à l'ultracentrifugation, ils semblent avoir des poids moléculaires assez faibles.

La fraction E₂ présente, en outre, certains caractères qui sont en faveur de la présence d'acides nucléiques : d'une part, elle est relative-

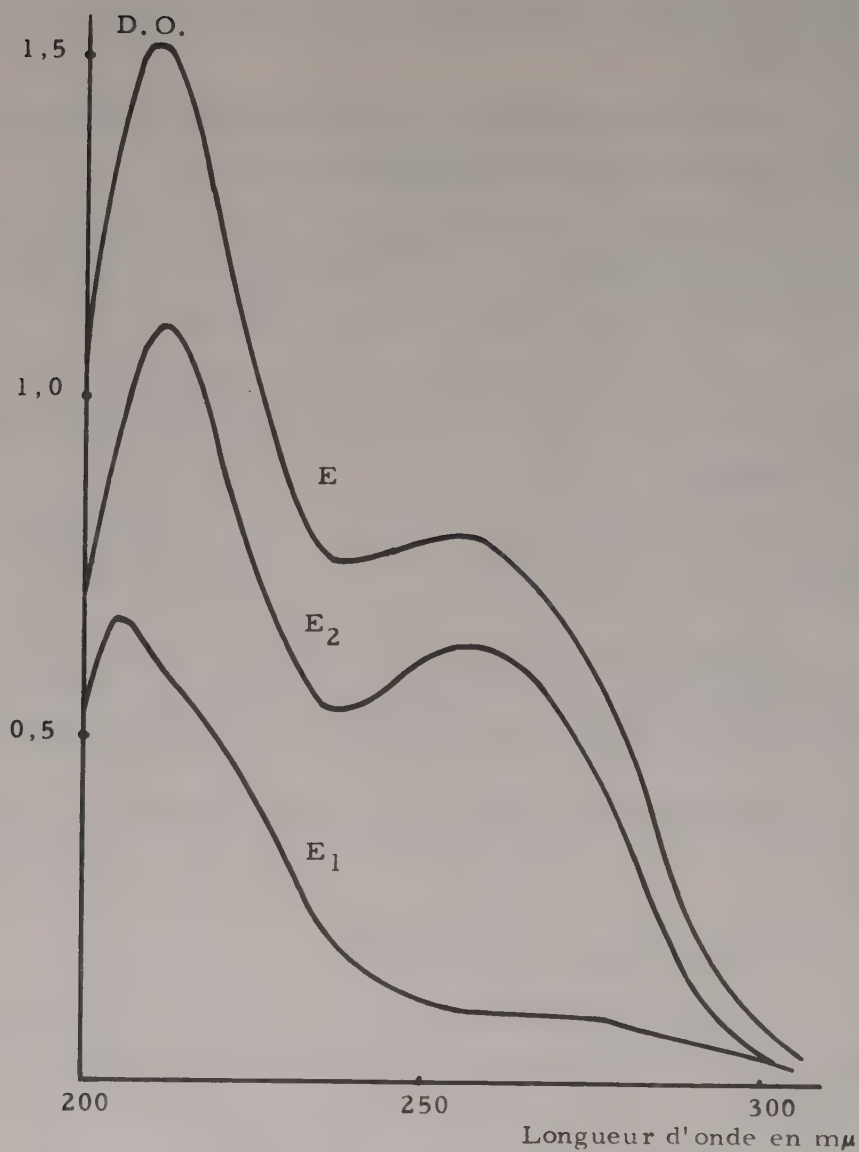


Figure n° 13

Spectres d'absorption dans l'ultra-violet
 Fraction E - Fraction E₁ - Fraction E₂

ment riche en phosphore (4,2 p.100) ; d'autre part, son spectre d'absorption dans l'ultra-violet (figure n° 13) présente deux maximums, l'un à $212\text{ m}\mu$ et l'autre à $255\text{ m}\mu$, longueur d'onde qui correspond aussi au maximum d'absorption des acides nucléiques.

Les résultats de l'électrophorèse et ceux de l'ultracentrifugation s'accordent pour indiquer qu'il existe dans la fraction E_2 au moins deux composants.

La chromatographie sur gel de SEPHADEX nous a donc permis de séparer la fraction F en deux groupes de constituants, dont nous avons déterminé un certain nombre de caractères physicochimiques. Il ne nous paraît pas utile de poursuivre plus avant l'analyse de ces deux groupes, tant qu'une expérimentation sur la souris ne nous aura pas renseignés sur l'activité biologique de chacun d'eux.

SIXIEME PARTIE

ESSAI D'INTERPRETATION DES RESULTATS DE L'EXPERIMENTATION BIOLOGIQUE

I - TRAVAUX ANTERIEURS SUR LA PROTECTION CONTRE LA CANCERISATION PAR LES HYDROCARBURES PO- LYCYCLIQUES.

1 - PROTECTION PAR DES AGENTS CHIMIQUES :

Depuis les travaux de BERENBLUM (4) (5) (6), en 1929, montrant que le sulfure d'éthyle dichloré (Ypérite) exerce une action inhibitrice sur la formation des tumeurs cutanées induites par le goudron et le 1, 2, 5, 6 - dibenzanthracène, on a découvert que de nombreux composés appartenant à des groupes chimiques différents sont capables de retarder l'apparition des tumeurs provoquées par certains hydrocarbures polycycliques et de diminuer le nombre des animaux cancérisés.

Après avoir examiné l'ensemble des travaux effectués dans ce domaine, nous pouvons classer en cinq catégories les substances douées d'un

pouvoir protecteur contre la cancérogénèse induite par les hydrocarbures polycycliques :

- certains hydrocarbures polycycliques,
- les composés chlorés hydrolysables,
- le bromobenzène,
- les anhydrides de diacides $\alpha \beta$ insaturés,
- la vitamine A

A) Les hydrocarbures polycycliques :

LACASSAGNE et ses collaborateurs (64) (65) ont montré qu'il est possible de freiner le processus de cancérisation cutanée provoqué par le 20-méthyl-cholanthrène, chez la souris, en mélangeant l'agent cancérogène avec du chrysène, du 1, 2, 5, 6-dibenzofluorène ou du 1, 2-benzanthracène (93).

Plus tard, RIEGEL et ses collaborateurs (89) ont recherché cette propriété chez d'autres hydrocarbures polycycliques. Ils ont constaté que l'apparition des tumeurs cutanées provoquées par le 20-méthyl-cholanthrène est retardée si du 1, 2, 5, 6-dibenzanthracène est appliqué sur la peau des souris en même temps que le produit cancérogène. Le 1, 2, 7, 8-dibenzofluorène, le chrysène et le fluorène ne possèdent pas cet effet protecteur, ce qui, dans le cas du chrysène, est en contradiction avec les résultats de LACASSAGNE.

Reprenant cette expérimentation, HILL et ses collaborateurs (54) (55) ont remarqué que l'action d'un autre cancérogène puissant, le 9, 10-diméthyl 1, 2-benzanthracène (D M B A) est atténuée quand ce produit est appliqué mélangé avec l'un des hydrocarbures suivants :

- le 6, 8-diméthyl 1.2 benzanthrène,
- le 1, 2, 5, 6-dibenzofluorène,
- le 1, 2-benzanthracène,
- le 2' éthyl 1, 2-benzanthracène,

le 7 méthyl 1, 2-benzanthracène,
ou le 8 méthyl 1, 2-benzanthracène.

HILL et ses collaborateurs ne trouvent de pouvoir protecteur ni au naphthalène, ni à l'anthracène, ni au fluorène. Ces résultats sont partiellement en désaccord avec ceux de CRABTREE (30).

Poursuivant leurs recherches dans ce domaine, HILL et ses collaborateurs (56) ont constaté que de très faibles concentrations de 20-méthyl-cholanthrène retardent l'apparition des tumeurs provoquées par le D.M.B.A. En revanche, de faibles concentrations de D.M.B.A. n'influencent pas la cancérisation provoquée par le 20-méthyl-cholanthrène.

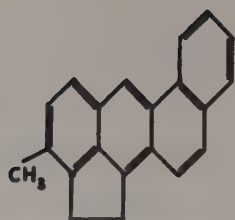
Dans le même ordre d'idée, on peut citer les travaux de KOTIN et FALK (36) (63) qui ont étudié le pouvoir protecteur des dérivés plus ou moins hydrogénés du 20-méthyl-cholanthrène et du 1, 2, 5, 6-dibenzanthracène contre l'action cancérogène de ces deux hydrocarbures. Ils ont trouvé que les dérivés partiellement hydrogénés (dihydro, décahydro) freinent considérablement et même empêchent la cancérisation. Par contre, les dérivés totalement hydrogénés qu'ils ont expérimentés dans les mêmes conditions ne manifestent plus d'effet protecteur.

En résumé, de nombreux hydrocarbures polycycliques, faiblement ou non cancérogènes, à condition qu'ils ne soient pas saturés, sont capables d'exercer une protection locale contre la cancérisation induite par les hydrocarbures polycycliques hautement cancérogènes.

B) Composés chlorés hydrolysables :

Reprenant les travaux de BERENBLUM sur l'inhibition par le sulfure d'éthyle dichloré de la cancérisation induite par les hydrocarbures polycycliques, CRABTREE (27) a expérimenté une série d'autres dérivés chlorés aisément hydrolysables : chlorures d'acétyle, de myristyle, de palmityle et de stéaryle, ainsi que le sulfochlorure de benzène.

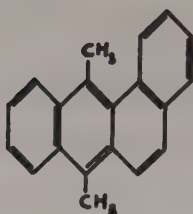
Le produit protecteur et l'agent cancérogène, tous les deux en so-



20 - méthylcholanthrène



1, 2, 5, 6 - dibenzofluorène



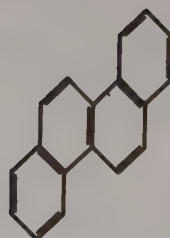
9, 10 - diméthyl - 1, 2 - benzanthracène



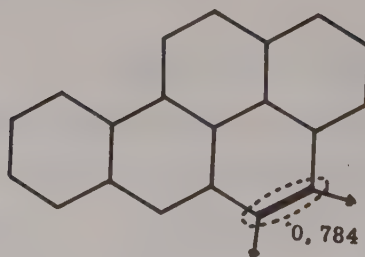
Fluorène



1, 2, 5, 6 - dibenzanthracène



Chrysène



0, 455

0, 455

0, 784

Région K

benzo 3, 4-pyrène
(d'après PULLMAN)

lution dans l'éther, sont appliqués sur la peau de la souris, au même endroit, à raison de deux fois par semaine pour l'agent cancérigène et de quatre fois par semaine pour le produit protecteur.

Tous les dérivés expérimentés ont retardé l'apparition des tumeurs cutanées.

C) Le bromobenzène :

Le bromobenzène possède également la propriété de protéger la souris contre l'action cancérigène du benzo 3,4-pyrène ; cette propriété a été mise en évidence par les travaux de CRABTREE (28). L'application sur la peau de la souris de bromobenzène en solution éthérée, alternant avec celle de benzo 3,4-pyrène, retarde et dans certains cas empêche l'apparition des épithéliomas. Cette protection est le résultat d'une action locale, car, ainsi que l'a montré CRABTREE, si le bromobenzène n'est plus appliqué au même endroit que le benzo 3,4-pyrène, l'effet protecteur ne se manifeste pas.

D) Les anhydrides de diacides $\alpha \beta$ - insaturés :

S'adressant à un autre groupe de composés chimiques, CRABTREE (29) a étudié l'influence de divers diacides organiques sur la cancérisation induite par le benzo 3,4-pyrène. L'auteur a préféré employer les anhydrides d'acides plutôt que les acides eux-mêmes, parce que ces derniers sont beaucoup moins solubles dans les solvants organiques. Dans ces expériences, le mode d'application du cancérigène et de la substance protectrice, est identique, à celui déjà décrit à propos des expériences précédentes.

Seuls les anhydrides de l'acide maléique et de l'acide citraconique (acide méthyl-2 maléique) se sont révélés actifs. La présence d'une double liaison dans la molécule semble indispensable, car l'acide malonique ne manifeste pas d'action protectrice.

E) La vitamine A :

Les travaux de ROSICKI et HATSCHEK (92) ont montré que la vitamine A diminue le nombre des tumeurs cutanées provoquées chez la souris par le benzo 3,4-pyrène, lorsque celle-ci est appliquée sur la peau alternativement avec le cancérrogène.

Tous ces produits possèdent une même propriété biologique, celle de retarder la production des tumeurs cutanées provoquées par certains hydrocarbures polycycliques. Bien qu'ils appartiennent à des familles chimiques différentes, on peut leur trouver un caractère commun, ils présentent une affinité plus ou moins marquée pour la fonction thiol :

- il est bien connu que le bromobenzène, comme d'ailleurs les autres dérivés monohalogénés du benzène, subissent dans l'organisme la conjugaison mercapturique ;

- à l'heure actuelle, on explique l'action cytostatique de l'ypérite par les altérations chromosomiales qu'elle provoque en s'unissant aux protéines et spécialement aux nucléoprotéines par l'intermédiaire de leurs groupements -SH ; cette fixation sur les nucléoprotéines a été démontrée expérimentalement par WHEELER et SKIPPER (123) à l'aide d'une ypérite à l'azote marquée au ^{14}C et au ^3H ;

- la combinaison des groupements -SH avec l'anhydride maléique et l'anhydride citraconique a été mise en évidence par CRABTREE (29), qui a dosé le glutathion réduit dans la peau de souris badigeonnées avec des solutions éthérées de ces anhydrides ; dans les heures qui suivent le badigeonnage, le taux du glutathion réduit diminue de 50 p.100 ;

- en ce qui concerne les hydrocarbures polycycliques, une première démonstration de leur affinité pour le groupement thiol a été fournie par plusieurs travaux dont ceux de BOYLAND et de LEVI (15), puis de CRABTREE (30) ; BOYLAND et LEVI ont mis en évidence la formation d'acide anthranylmercapturique par conjugaison de l'anthracène et de la cystéine N. acétylée ; CRABTREE a retrouvé avec le naphthalène, l'anthracène et le phénanthrène, une diminution importante du taux de gluta-

thion réduit dans la peau de souris badigeonnées avec des solutions éthérées de ces hydrocarbures ; de plus, il a trouvé une augmentation importante du taux de mercapturates dans les urines des animaux ainsi traités ;

- de même, FLESCH et GOLDSTONE (37) ont pu mettre en évidence que la vitamine A inactive les groupements SH de l'épiderme.

Pour expliquer l'effet anticancérogène des hydrocarbures polycycliques, LACASSAGNE (65) invoque une compétition entre le protecteur et l'hydrocarbure cancérogène au niveau des récepteurs sensibles. Il semble que cette notion de compétition puisse être étendue aux autres protecteurs de structure chimique différente. Et, étant donné l'affinité de tous ces composés pour la fonction thiol, on peut supposer que la compétition s'effectue au niveau des groupements -SH des récepteurs cellulaires. Mais cette hypothèse n'est plausible que si les hydrocarbures polycycliques cancérogènes sont eux-mêmes capables de réagir avec les groupements thiols.

Or, RONDONI (91) a pu établir que les hydrocarbures cancérogènes possèdent effectivement cette propriété. Ces hydrocarbures peuvent inhiber les enzymes protéolytiques, mais cette inhibition peut être levée par un apport de groupements -SH, sous forme de glutathion. Aux yeux de certains, la liaison entre les groupements -SH des récepteurs et les hydrocarbures serait une condition essentielle pour que la cancérisation se produise. Avec le benzo 3,4-pyrène, cette liaison se ferait au niveau de la région K ; il est intéressant, en effet, de remarquer que lors du métabolisme du benzo 3,4-pyrène, l'oxydation n'a pas lieu au niveau de la double liaison de la région K (position 6, 7) mais au voisinage (position 8, 9) ; la région K étant considérée comme la position la plus réactive de la molécule de l'hydrocarbure polycyclique, on doit admettre que cette région est protégée de l'oxydation par une liaison préalable avec les récepteurs cellulaires. Cette liaison constituerait l'étape initiale dans le phénomène de la cancérisation. Toutefois, il est vraisemblable que la liaison protéine-hydrocarbure polycyclique ne se fait pas uniquement par l'intermédiaire de la région K, mais aussi au niveau de la région L (20) (78). Ce serait alors une explication des exceptions observées avec certains hydrocarbures poly-

cycliques non cancérogènes qui donnent cependant des combinaisons protéiques stables. En effet, il est parfaitement possible que ces hydrocarbures non cancérogènes forment une liaison avec les protéines par l'intermédiaire de leur région L.

A la lumière de l'ensemble de ces observations, on peut donc admettre que les hydrocarbures polycycliques cancérogènes viennent se combiner aux groupements -SH des récepteurs sensibles qui sont vraisemblablement de nature enzymatique.

Si, par suite d'un phénomène de compétition, d'autres composés doués d'affinité pour les thiols viennent empêcher la fixation de l'hydrocarbure cancérogène sur les groupements -SH des récepteurs, celui-ci n'aura pas la possibilité d'exercer son action locale avant d'être métabolisé ou entraîné dans la circulation générale. Cette compétition aboutit à la fixation d'une moins grande quantité d'hydrocarbure cancérogène sur les récepteurs et, par voie de conséquence elle retarde l'apparition des tumeurs, et dans certains cas, en diminue la fréquence.

Si l'affinité pour les thiols des hydrocarbures cancérogènes et des agents protecteurs est à la base des phénomènes de compétition, on peut envisager un second type de compétition, cette fois vis-à-vis des hydrocarbures cancérogènes, entre les récepteurs porteurs de groupements -SH et certains composés chimiques de la famille des thiols. Cette hypothèse a été émise, puis vérifiée par LUSKY, BRAUN et WODDARD (70) et CRABTREE (31).

Ces auteurs réduisent le pourcentage des tumeurs d'une manière statistiquement significative chez les souris badigeonnées avec une solution de benzo 3,4-pyrène en leur appliquant sur les surfaces traitées une pommade contenant 5 p. 100 de dimercaptopropanol (BAL). Ce résultat peut être interprété de la manière suivante : le BAL entre en compétition avec les -SH des protéines pour fixer l'hydrocarbure cancérogène qui forme alors une combinaison incapable de réagir avec les thiols des récepteurs.

Un résultat analogue avait déjà été obtenu par REIMAN et HALL,

en 1936 (88), en appliquant alternativement sur la peau de la souris une solution benzénique de 1, 2, 5, 6-dibenzanthracène et du parathiocrésol, sous forme de pommade à 0,5 p. 100 dans la lanoline.

A l'appui de la thèse de la compétition entre les hydrocarbures polycycliques au niveau des groupements -SH, il faut également citer une autre expérience de CRABTREE (31). En appliquant alternativement sur la même région de surface cutanée, chez la souris, un hydrocarbure cancérigène, un hydrocarbure reconnu comme ayant des propriétés anticancérigènes et du dimercaptopropanol, cet auteur n'obtient plus aucune protection ; il explique la suppression de l'effet anticancérigène par une double compétition : l'hydrocarbure protecteur se combinant au dimercaptopropanol, ne peut plus entrer en compétition avec l'hydrocarbure cancérigène au niveau des récepteurs biologiques. Ce dernier ne rencontre donc plus aucun obstacle pour se fixer et exercer son action sur la peau. Cette interprétation implique que l'agent anticancérigène possède une plus grande affinité pour le dimercaptopropanol que l'hydrocarbure cancérigène lui-même.

En résumé, tous les phénomènes d'inhibition que nous venons de citer dépendent d'une action exclusivement locale. Si l'on admet que la phase initiale de la cancérisation induite par les hydrocarbures polycycliques consiste en la fixation de ces hydrocarbures sur les protéines de la peau par l'intermédiaire de leurs fonctions -SH, tous ces processus d'inhibition relèvent d'un phénomène d'inhibition compétitive. La compétition peut s'effectuer soit au niveau des récepteurs, entre l'hydrocarbure cancérigène et le protecteur, soit vis-à-vis de l'hydrocarbure, entre le récepteur et un composé chimique de la famille des thiols.

2 - INFLUENCE DU REGIME ALIMENTAIRE SUR LA CANCERISATION INDUITE PAR LES HYDROCARBURES POLYCYCLIQUES :

Les travaux de TANNEBAUM et d'autres auteurs (106) (104) (101) (105) (125) ont démontré que le régime alimentaire des animaux traités avec des hydrocarbures polycycliques influence largement la fréquence des tumeurs ainsi que leur délai d'apparition. Les variations présentées dans

la cancérisation dépendent de la quantité et aussi de la composition des aliments donnés aux animaux.

Du point de vue quantitatif, tous les résultats obtenus montrent qu'une diminution du nombre de calories ingérées réduit le pourcentage et retarde l'évolution des tumeurs provoquées par l'application cutanée ou l'injection sous-cutanée de substances cancérogènes.

En faisant varier la composition du régime, TANNEBAUM (102) a trouvé que l'augmentation de l'apport en glucides favorise la cancérisation. De même l'augmentation de la proportion de lipides dans la ration alimentaire abrège le temps de latence et augmente la fréquence des tumeurs provoquées par le goudron de houille ou les hydrocarbures polycycliques (57) (103). Quant à la composition en protéines, elle n'a pas d'influence sensible ni sur la fréquence des tumeurs, ni sur l'évolution tumorale. Néanmoins, on a trouvé qu'un régime carencé en cystéine réduit considérablement la fréquence des leucémies provoquées par le méthylcholanthrène (124).

Ces observations soulignent la nécessité, au cours des expériences de cancérisation induite par des substances chimiques, de donner aux animaux une alimentation de composition constante.

II - TRAVAUX PERSONNELS SUR LA PROTECTION CONTRE LA CANCERISATION PAR LES HYDROCARBURES POLYCYCLIQUES.

A ce stade de la discussion, il ne nous paraît pas inutile de rappeler l'hypothèse qui a motivé notre travail : rechercher dans la vésicule biliaire l'existence de substances capables d'activer le métabolisme et d'accélérer la détoxication du benzo 3,4-pyrène, chez des animaux de laboratoire recevant cet agent cancérogène en application cutanée, cette action devant se traduire par une réduction des effets cancérogènes de l'hydrocarbure polycyclique. Les expériences que nous avons effectuées tendent à prouver qu'il existe bien dans la vésicule biliaire de mouton un facteur capable de protéger les souris de race SWISS contre la cancérisa-

tion induite par le benzo 3,4-pyrène, facteur qui est vraisemblablement de nature protéique.

Comparé aux agents protecteurs que nous avons examinés précédemment, ce "facteur vésiculaire" présente trois caractères originaux :

- il est actif quand il est administré par voie générale, alors que tous les autres protecteurs cités n'exercent leur action que s'ils sont appliqués directement sur la plage cutanée traitée avec le benzo 3,4-pyrène ;

- il est de nature biologique, élaboré par l'organisme d'un mammifère, à l'inverse des autres agents protecteurs qui sont des produits de synthèse ;

- il semble dépourvu de toxicité, même quand il est administré par voie parentérale à doses élevées.

Pour tenter d'expliquer le mode d'action du "facteur vésiculaire", nous pouvons envisager plusieurs hypothèses.

En premier lieu, nous pouvons supposer qu'il existe une action compétitive entre les récepteurs sensibles et ce facteur, au stade de la fixation de l'hydrocarbure cancérigène. L'accumulation du benzo 3,4-pyrène dans la paroi vésiculaire observée par GRAFFI (51) (49) plaide en faveur de cette hypothèse. En effet, si le benzo 3,4-pyrène est retenu à ce niveau, c'est vraisemblablement parce qu'il est énergiquement fixé sur un support biologique qu'on peut supposer être le facteur que nous avons extrait. Injecté chez la souris, ce produit pourrait diffuser dans tout l'organisme et vu sa grande affinité pour le benzo 3,4-pyrène, protéger les récepteurs qui jouent un rôle dans les premières phases de la cancérisation. Mais, en admettant que cette hypothèse soit vérifiée, la fraction E qui renferme le "facteur vésiculaire" n'est pas suffisamment riche en soufre pour que la fixation de l'hydrocarbure cancérigène sur ce facteur puisse s'effectuer par l'intermédiaire de groupements thiols. Il faudrait donc envisager la possibilité d'un mode de fixation différent de celui qui est admis pour la compétition avec les protecteurs chimiques.

Toujours dans l'hypothèse d'un processus compétitif, on pourrait envisager le blocage des récepteurs sensibles par le facteur vésiculaire, mais cette hypothèse paraît peu vraisemblable. Etant donné la faible quantité de produit injecté, il est difficile d'admettre que sa concentration dans la peau soit suffisante pour protéger l'ensemble des récepteurs sensibles au niveau de la plage cutanée imprégnée de benzo 3, 4-pyrène.

Une seconde hypothèse consiste à supposer que des phénomènes enzymatiques interviennent pour provoquer une accélération de la dégradation métabolique du benzo 3, 4-pyrène, ce qui aurait pour effet de diminuer la concentration de l'agent cancérogène au niveau des récepteurs et par conséquent de retarder l'apparition des tumeurs. CONNEY et ses collaborateurs (22) (23) ont montré qu'il existe dans le foie un ensemble d'hydroxylases capables de métaboliser le benzo 3, 4-pyrène, qu'ils ont appelé, la benzo pyrène-hydroxylase. Cette enzyme nécessite, pour son activité, la présence de TPNH et d'oxygène. Elle a été retrouvée dans d'autres organes, tels que le poumon, les reins et le tube digestif, notamment au niveau de l'intestin grêle (119) (120) (42), et l'administration d'hydrocarbures polycycliques tels que le benzo 3, 4-pyrène, le 3-méthylcholanthrène, le 7, 12-diméthyl 1, 2-benzanthracène, augmente considérablement le taux de la benzopyrène-hydroxylase dans les divers organes.

Cette enzyme étant très fragile, elle ne peut pas résister aux manipulations nécessaires à l'isolement de la fraction protéique, à partir des vésicules de mouton. Il faut donc écarter l'hypothèse qui consiste à imaginer que le produit injecté chez la souris contient une forte proportion de benzopyrène-hydroxylase. Dans ces conditions, le seul mode d'action du "facteur vésiculaire" pourrait être une stimulation de l'élaboration de la benzopyrène-hydroxylase au niveau de différents organes et en particulier du foie. Il serait possible d'étudier cette éventualité en comparant l'activité enzymatique de la benzopyrène-hydroxylase du foie dans deux lots d'animaux traités, l'un avec du benzo 3, 4-pyrène et l'autre avec du benzo 3, 4-pyrène et le "facteur vésiculaire". Un accroissement très important de cette activité dans le second lot par rapport au premier permettrait de penser que le "facteur vésiculaire" favorise la détoxication du benzo 3, 4-pyrène.

Enfin, il est possible d'envisager une autre hypothèse reposant sur une conception particulière de la cancérogénèse chimique, aujourd'hui admise par un grand nombre d'auteurs (96 - 95 - 97 - 98 - 58 - 59 - 60 - 90 - 39 - 40 - 45 - 46) : la cancérisation induite par les substances chimiques serait le résultat de deux processus dont l'un se manifesterait au cours d'une "phase initiale" et l'autre au cours d'une "phase de réalisation". La "phase initiale" correspondrait à une modification biologique d'ordre général, sans manifestation visible, mais prédisposant certaines catégories de cellules de l'organisme à la dégénérescence cancéreuse. La "phase de réalisation" aboutirait, elle, à l'apparition de la tumeur sous l'effet d'une irritation locale non spécifique. On peut, en effet, avec GRAFFI (50), BERENBLUM (7) et HARAN (53), distinguer deux catégories de cancérogènes : les cancérogènes parfaits, tels que le benzo 3,4-pyrène, le 20-méthyl cholanthrène, etc, capables de réaliser les deux phases de la cancérisation, et les cancérogènes imparfaits (co-cancérogènes), tels que l'huile de croton, qui ne peuvent engendrer que la "phase de réalisation" et sont de ce fait incapables de provoquer, par leur seule action, la formation de tumeurs cancéreuses.

Ainsi, l'administration à des souris d'une seule dose (100 μ g) d'un hydrocarbure cancérogène en solution dans une huile minérale, par voie locale, orale ou parentérale, ne fait apparaître qu'un nombre réduit de tumeurs et seulement après un temps de latence prolongé d'au minimum 10 à 12 mois. Mais, si l'on procède à des applications répétées d'une solution à 5 p.100 d'huile de croton dans l'huile de paraffine sur la peau des animaux préparés par l'administration d'une seule dose de benzo 3,4-pyrène on fait apparaître rapidement de nombreuses tumeurs cutanées, exclusivement localisées au niveau des endroits traités par l'huile de croton. Or, l'application répétée d'huile de croton seule (co-cancérogène) sur la peau de souris normales ne provoque jamais l'apparition de tumeurs malignes.

Dans l'expérience précédente, la fréquence des tumeurs est indépendante du délai qui s'écoule entre l'administration du benzo 3,4-pyrène et le début des applications de l'huile de croton, ce qui témoigne de la per-

sistance de l'état particulier créé par l'administration de l'hydrocarbure cancérogène.

D'autres facteurs irritants, tels que les brûlures ou le décapage de la surface cutanée, et d'une façon générale tous les agents provoquant des proliférations régénératives au niveau de la peau exercent un effet identique à celui de l'huile de croton.

En présence d'une telle conception de la cancérogénèse, on peut imaginer que, durant la "phase initiale", l'agent cancérogène provoquerait dans un ou plusieurs organes, une lésion biochimique conduisant à l'arrêt d'une sécrétion endocrine, dont le produit interviendrait dans la régulation des processus métaboliques cellulaires. La carence en ce produit engendrerait un état propice à la cancérisation des cellules. A l'appui de cette hypothèse, on peut citer les constatations faites par FARLE (34) qui a observé une dégénérescence néoplasique dans des cultures de cellules après un délai de un à deux ans, transformation qu'il attribue à l'existence possible d'une carence en facteurs de régulation.

Il serait possible d'expliquer les résultats de nos expériences en fonction de cette théorie. On pourrait en effet supposer que la vésicule biliaire joue un rôle de premier plan dans cette fonction endocrine, sensible à l'effet du cancérogène. L'hypothèse formulée par TUSQUES et SENELAR (111) selon laquelle la vésicule biliaire possède une fonction endosécrétrice serait favorable à une telle conception. L'injection de la substance que nous avons appelée "facteur vésiculaire" agirait alors en apportant à l'organisme un principe dont le prive l'action du benzo 3, 4-pyrène.

Si cette théorie s'avérait exacte, il devrait être possible de mettre à profit l'action biologique du "facteur vésiculaire" pour pallier les conséquences des altérations provoquées dans les métabolismes de l'épithélium de la vésicule par d'autres causes que les hydrocarbures cancérogènes. L'injection du "facteur vésiculaire" devrait donc pouvoir exercer une action sur les tumeurs malignes autres que celles induites par ces hydrocarbures.

III - EXPERIMENTATION COMPLEMENTAIRE - ETUDE DE LA FRACTION PRÔTEIQUE (FRACTION E) SUR L'EVOLUTION D'UNE TUMEUR SPONTANEE (CARCINOME MAMMAIRE DE LA SOURIS C 3 H.)

Les considérations précédentes nous ont amenés à rechercher l'effet du "facteur vésiculaire" sur une tumeur spontanée d'un animal de laboratoire, le carcinome mammaire des souris de la lignée C 3 H. Chez les femelles de cette lignée, âgées d'au moins 10 mois, des tumeurs mammaires spontanées apparaissent avec une fréquence voisine de 100 p. 100. Trois facteurs participent à la genèse de ces carcinomes : une prédisposition génétique, une stimulation hormonale de la glande mammaire provoquée soit par les grossesses (deux au minimum), soit par l'injection d'hormones oestrogènes, et enfin un facteur viral, le facteur lacté de BITTNER.

1 - MODE D'EXPERIMENTATION :

Nous avons pu disposer pour cette expérience d'un élevage de souris C 3 H issu d'un couple remis au laboratoire d'Histologie et d'Embryologie de la Faculté de Nantes par le laboratoire d'Anatomie comparée de la Faculté des Sciences d'Orsay, en 1962. Ces souris présentent spontanément une tumeur mammaire quand elles sont âgées de 8 à 12 mois et ont présenté deux grossesses. L'apparition des tumeurs n'est pas accélérée par un traitement adjuvant avec des oestrogènes.

Nous avons réparti les souris cancérisées en deux groupes : un groupe d'animaux témoins ne subissant aucun traitement et un groupe d'animaux traités recevant trois fois par semaine, en injection sous cutanée, 0,3 ml de la fraction protéique.

Les souris sont alternativement inscrites dans un groupe ou dans l'autre, au fur et à mesure de l'apparition des tumeurs. Onze mois (du 14 décembre 1965 au 14 novembre 1966) ont été nécessaires pour réunir les 40 souris utilisées dans cette expérimentation.

Tenant compte du fait qu'il ne s'agit plus de prévenir l'apparition de tumeurs mais de freiner l'évolution de carcinomes déjà constitués, il nous a paru nécessaire d'avoir recours à de plus fortes doses de produit actif. En effet, nous avons observé au cours de la première expérience effectuée avec l'extrait total de vésicule biliaire sur des souris cancérisées par le benzo 3,4-pyrène, que cet extrait prolonge la survie des animaux cancérisés, mais dans une proportion qui n'est pas significative (probabilité de 75 p.100). Nous pouvions donc espérer obtenir un effet plus accentué en utilisant une solution plus riche en principe actif. Nous avons donc préparé une solution deux fois plus concentrée en fraction protéique. Dans ce but, nous avons repris le culot de centrifugation fourni par la précipitation alcoolique de 20 ml d'extrait aqueux total, non plus par 20 ml de solution de chlorure de sodium à 8 g/l, mais seulement par 10 ml de cette solution. Ainsi que nous l'avons vérifié avant de procéder aux électrophorèses, une telle concentration est bien inférieure à la limite de solubilité.

Nous estimons qu'il est important de préciser que les injections sont commencées chez chaque souris dès qu'une tumeur est décelée à la palpation. En effet, au cours d'essais préliminaires, nous avons pu observer que des injections de fraction E sont inopérantes lorsqu'elles sont commencées plusieurs jours après l'apparition des tumeurs mammaires.

2 - RESULTATS ET DISCUSSION :

Les résultats de cette expérimentation sont rassemblés dans le tableau n° 15. Dans le lot témoin, la durée moyenne de survie est de 47 jours après l'apparition de la tumeur. Cette durée atteint 65 jours dans le lot des animaux recevant les injections de fraction protéique. La comparaison de ces deux valeurs, grâce au test t, indique qu'il existe entre elles une différence significative avec une probabilité de 98,4 p.100. Ce résultat montre donc que le "facteur vésiculaire" présent dans la fraction protéique est capable de freiner l'évolution du carcinome mammaire de la souris C3H.

Ce résultat constitue un argument en faveur d'une action du "facteur vésiculaire" qui ne se limiterait pas à la protection contre la cancéri-

Durée de survie en jours

Lot témoin	Lot traité
17	64
21	70
67	80
44	42
42	77
75	55
31	45
91	108
35	93
72	29
80	49
48	70
35	47
21	80
59	50
49	46
37	68
35	42
75	69
23	114
$\bar{x} = 47$	$\bar{x} = 65$
$\sigma = 22,3$	$\sigma = 22,6$
$t = 2,51$ ($t = 2,70$ pour une probabilité de 99 p.100)	

TABLEAU n° 15

Ayant décelé l'existence de cette action protectrice, nous avons cherché à préciser la nature du facteur qui en est responsable. Dans ce but, nous avons commencé par effectuer l'analyse de l'extrait total, comptant sur les résultats de cette analyse pour donner une orientation au fractionnement de l'extrait. Lorsque nous nous sommes trouvés en possession de plusieurs séries de résultats, il nous est apparu que deux fractions étaient susceptibles de contenir le facteur biologique doué de l'activité que nous étudions, la fraction lipidique et la fraction protéique.

L'expérimentation de ces deux fractions sur la souris a révélé que seule la fraction protéique exerce une action protectrice contre l'effet cancérogène du benzo 3,4-pyrène. La fraction lipidique est totalement dénuée d'activité.

Grâce à une étude électrophorétique sur gel de polyacrylamide, nous avons pu montrer que cette fraction protéique renferme au moins cinq constituants.

Poursuivant nos investigations, nous avons essayé de séparer ces constituants. L'utilisation de la chromatographie sur gel SEPHADEX, nous a permis d'isoler deux groupes de composés. L'un contient des produits de nature osidique ne renfermant que des traces d'azote et de phosphore et peu de soufre ; l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide et l'ultracentrifugation montrent qu'il renferme au moins trois constituants dont les poids moléculaires ne doivent pas être inférieurs à 200 000.

L'autre groupe contient des produits riches en azote et en phosphore et pauvres en oses et en soufre ; à l'électrophorèse et à l'ultracentrifugation, ce groupe paraît formé d'au moins deux constituants dont les poids moléculaires sont inférieurs à 100 000.

Cherchant à expliquer les processus qui peuvent intervenir dans ce phénomène de protection, nous avons envisagé plusieurs hypothèses. La première consiste à rechercher une analogie entre le mode d'action du "facteur vésiculaire" et celui des divers produits pour lesquels des travaux

antérieurs ont montré qu'ils possèdent la faculté de freiner la cancérisation induite par les hydrocarbures polycycliques. Ces produits sont, soit des hydrocarbures polycycliques non ou faiblement cancérigènes, soit des anhydrides de diacides non saturés (anhydride maléique ou anhydride citraconique), soit encore le dimercaptopropanol. Il est toutefois difficile d'établir un rapprochement entre le "facteur vésiculaire" et ces divers produits, car il existe des différences marquées entre les conditions de leurs actions respectives. Le "facteur vésiculaire" agit par la voie générale, tandis que tous les autres inhibiteurs ne peuvent agir que s'ils sont appliqués localement sur la plage cutanée qui reçoit l'agent cancérigène.

Comme autre hypothèse, nous avons envisagé la possibilité d'une stimulation de l'élaboration de la benzo-pyrène hydroxylase par l'organisme sous l'influence du "facteur vésiculaire". Il est déjà connu que les applications de benzo 3,4-pyrène provoquent une augmentation du taux de cette enzyme dans divers organes notamment dans le foie.

Enfin, notre attention a été particulièrement retenue par une autre hypothèse qui attribuerait au "facteur vésiculaire" une action plus étendue, qui n'intéresserait pas seulement les phénomènes de cancérisation dus aux agents chimiques. Certaines théories tendent à considérer que l'organisme possède des moyens de défense capables de s'opposer à la prolifération des cellules malignes. Il est alors permis de penser que le "facteur vésiculaire" pourrait participer directement ou indirectement à ces mécanismes de défense, contribuant ainsi à augmenter la résistance du terrain contre la maladie cancéreuse. Nous avons obtenu un premier résultat expérimental qui semble favorable à cette hypothèse. Le "facteur vésiculaire" s'est révélé capable de prolonger d'une manière significative la durée de survie des souris C3H présentant un carcinome mammaire, ce qui traduit vraisemblablement une action freinatrice sur l'évolution de la tumeur maligne. Il semble donc bien que le "facteur vésiculaire" puisse exercer un effet protecteur qui s'étende à des formes de néoplasies autres que celles qui sont induites par des agents chimiques.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - ASSOUS E.F. et GIRARD M.L. - Ann. Biol. Clin. 1962 - 10 - 12 - 973
- 2 - BADINAND A. et VALLOÑ J.J. - Chim. Anal. 1966 - 46 - 313
- 3 - BAUER et HAKKI - Presse Médicale - 1932 - 34 - 650
- 4 - BERENBLUM I. - J. Path. Bact. - 1929 - 32 - 425
- 5 - BERENBLUM I. - J. Path. Bact. - 1931 - 34 - 731
- 6 - BERENBLUM I. - J. Path. Bact. - 1935 - 40 - 549
- 7 - BERENBLUM I. et HARAN N. - Brit. J. Cancer - 1957 - 11 - 85
- 8 - BERNARD S., LE CAM M., DUBIN J.C. et MADEC Y. - Soc. Biol. - 1965 - 12 - 2387
- 9 - BLANC P., BERTRAND P. LIANDIER L. - Chim. Anal. - 1955 - 37 - 305
- 10 - BLIX G. - Acta Chem. Scand. - 1948 - 2 - 467
- 11 - BOHUON C. - Ann. Biol. Clin. - 1958 - 1 - 2 -
- 12 - BOHUON C. - Clin. Chim. Acta - 1962 - 7 - 811
- 13 - BOITEAU H. et PAULET G. - J. Physiol. Paris 1955 - 47 - 605
- 14 - BOYD J.R. - Anal. Chem. - 1952 - 24 - 805
- 15 - BOYLAND E. et LEVI A.A. - Biochem J. 1936 - 30 - 1225
- 16 - BOYLAND E. et WEIGERT F. - Brit. Med. Bull. - 1947 - 4 - 968
- 17 - BURGER M. et UIKER - Klin. Wschr - 1937 - 16 - 334
- 18 - CAPELLE R. - Chim. Anal. - 1960 - 42 - 69 - 127 - 181
- 19 - CAPELLE R. - Chim. Anal. - 1961 - 43 - 111
- 20 - CHALVET O., DAUDEL R. et MOSER C. - Cancer Research - 1958 - 18 - 1033

- 21 - CHARLOT G. - Dosage colorimétrique des éléments minéraux -
Masson 1961 - p. 93
- 22 - CONNEY A.H., GILETTE J.R., INSCOE J.K., TRAMS E.R. et
POSNER H.S. - Science 1959 - 130 - 1478
- 23 - CONNEY A.H., MILLER E.C. et MILLER J.A. - J. Biol.
Chem. 1957 - 228 - 753
- 24 - COOK J.W. et HASLEWOOD G.A.D. - Chem. Industries -
1933 - 52 - 758
- 25 - COOK J.W. et SCHOENTHAL R. - Brit. J. Cancer - 1952 - 6 -
400
- 26 - COOPER M.D. - Anal. Chem - 1953 - 25 - 411
- 27 - CRABTREE H.G. - Cancer Research - 1941 - 1 - 39
- 28 - CRABTREE H.G. - Cancer Research - 1944 - 4 - 688
- 29 - CRABTREE H.G. - Cancer Research - 1945 - 5 - 346
- 30 - CRABTREE H.G. - Cancer Research - 1946 - 6 - 553
- 31 - CRABTREE H.G. - Brit. J. Cancer - 1948 - 2 - 281
- 32 - DAVIS B.J. - Disc electrophoresis - II - Reprinted by Distillation
Products Industries Rockester N. Y.
- 33 - DELSAL - Bull. Soc. Chim. Biol. - 1944 - 26 - 99
- 34 - EARLE - J. Nat. Cancer Inst. - 1957 - 19 - 781
- 35 - ELSON L.A. et MORGAN W.T.J. - Biochem J. - 1933 - 27 - 1824
- 36 - FALK H.L., KOTIN P. et THOMPSON S. - Arch. environnement
Health - 1964 - 9 - 1969
- 37 - FLESCH P. et GOLDSTONE S.B. - J. Invest. Derm. - 1952 -
18 - 267
- 38 - FLEURY P. et EBERHARD R. - Ann. Biol. Clin. - 1951 - 10 - 453
1952 - 3-4 - 165
- 39 - FRIEDEWALD W.F. et ROUS P. - J. Exper. Med. - 1944 - 80 - 101
- 40 - FRIEDEWALD W.F. et ROUS P. - J. Exper. Med. - 1944 - 80 - 127
- 41 - GARTON - Biochem J - 1957 - 67 - 345
- 42 - GELBOIN H.V. et BLACKBURN N.R. - Cancer Research -
1961 - 24 - 356
- 43 - GILES R.B., Jr, M.D., JOE Ed. SMITH, M.S., CROXLEY G.
A.B. and, MYRA MICHAEL, A.B. - J. Lab. Clin. Med. -
1960 - 55 - 38
- 44 - GORNALL - Mises au point biologiques - 1962 - Vigot Frères -
p. 114
- 45 - GRAFFI A. - Zschr. Ges. Inn. Med. - 1952 - 7 - 882
- 46 - GRAFFI A. - Abh. Dtsch. Akad. Wiss. Berlin - 1953 - 1 - 1

- 47 - GRAFFI A. et BIELKA H. - Problèmes de Cancérologie Expérimentale - Gauthier - Villars - 1963 - p. 95
- 48 - GRAFFI A. et BIELKA H. - Problème de Cancérologie Expérimentale - Gauthier - Villars - 1963 - p. 122
- 49 - GRAFFI A. et BIELKA H. - Problèmes de Cancérologie Expérimentale - Gauthier - Villars - 1963 - p. 211 - 217
- 50 - GRAFFI A., SCHARSACH F. et HEYER E. - Naturw - 1955 - 7 - 184
- 51 - GRAFFI A., SCHARSACH F. et KRISCHKE W. - Dtsch. Gesh. Wesen - 1953 - 8 - 1550
- 52 - HAMILTON P.B. et VAN SLYKE D.D. - J. Biol. Chem. - 1946 - 164 - 249
- 53 - HARAN N. et BEREMBLUM I. - Brit. J. Cancer - 1956 - 10 - 57
- 54 - HILL W.T., STANGER D.W., PIZZO A., RIEGEL B., SHUBIK P. and WARTMAN W.B. - 1951 - 11 - 892
- 55 - HILL W.T., STANGER D.W., PIZZO A., RIEGEL B., and WARTMAN W.B. - Cancer Research - 1952 - 12 - 270
- 56 - HILL W.T., STANGER D.W., RIEGEL B., and WARTMAN W.B. - Proc. Am. Ass. Cancer Research - 1954 - 1 - 20
- 57 - JACOBI H.P. et BAUMANN C.A. - Amer. J. Cancer - 1944 - 5 - 43
- 58 - KLEIN M. - J. Nat. Cancer Inst. - 1951 - 11 - 483
- 59 - KLEIN M. - J. Nat. Cancer Inst. - 1952 - 12 - 735
- 60 - KLEIN M. - Cancer Research - 1953 - 13 - 427
- 61 - KOGL - Biochem. Biophys Acta - 1960 - 43 - 95
- 62 - KOLTHOFF I.M. et LINGANE J.J. - Polarography. - 1952 - Tome 2 p. 508 Interscience Publishers, New-York
- 63 - KOTIN P. et FAKL H.L. - Science - 1956 - 123 - 102
- 64 - LACASSAGNE A. - BUU-HOI et CAGNIANT P. - Compt-Rend. Soc. Biol. - 1944 - 138 - 16
- 65 - LACASSAGNE A., BUU-HOI et RUDALI G. - Brit. J. Exp. Path. 1945 - 26 - 12
- 66 - LACHICA M. - GARRIDO - Analyst. - 1964 - 89- 61
- 67 - LE MOAN G. - Ann. Pharm. Franc - 1952 - 10 - 269
- 68 - LOISELEUR J. - Techniques de Laboratoire - Masson - Paris - 1963 - Tome II - p. 24 - 26
- 69 - LOMBARD - Cancérologie comparée - Doin - 1962 - p. 338

- 70 - LUSKY L.M., BRAUN H.A. and WODDARD G. - Cancer Research
1947 - 7 - 667
- 71 - MANN C.R. et YOEF J.H. - Anal. Chem. - 1956 - 28 - 202
- 72 - MAXFIELS and WOLINS W. - Clin. Chim. acta - 1959 - 4 - 647
- 73 - METAIS P., DEISS H. et WARTER J. - Bul. Soc. Chim. Biol. -
1957 - 39 - 4
- 74 - MICHEL M.C. cité par Vigneron - Amino-Acides, Peptides,
Protéines - Cahier n° 4 - p. 70
- 75 - Mises au point biologiques - Vigot Frères - 1962 - p. 67
- 76 - MONNET R., MORE P., POISBEAU J. et MORE M. Th. -
Bull. Soc. Pharm. de l'Ouest - 1966 - 8 - 97
- 77 - MONTELLA - Ann. Ital. Chir. (Bologna) - 1956 - 33 - 576
- 78 - OLIVIERO V.T. et HEIDELBERGER C. - Cancer Research -
1958 - 18 - 1094
- 79 - ORNSTEIN L. - Disc electrophoresis - I - Reprinted by Distillation
Products Industries Rockester N.Y.
- 80 - PATTON J., et REEDER W. - Anal. Chem. - 1958 - 28 - 1026
- 81 - PAVEL I. - La vésicule biliaire et ses voies d'excrétion - Masson
1959 - p. 28 - 31
- 82 - PAVEL I. - La vésicule biliaire et ses voies d'excrétion - Masson
1959 -
- 83 - PINTA M. - Recherche et dosage des éléments traces - Dunod - 1962 -
- 84 - PINTA M. - Recherche et dosage des éléments traces - Dunod - 1962 -
p. 562
- 85 - PINTA M. - Recherche et dosage des éléments traces - Dunod - 1962 -
p. 175 - 176
- 86 - POLONOWSKI M. et BOURRILON R. - Bull. Soc. Chim. Biol. -
1952 - 34 - 703
- 87 - PORATH J. - Clin. Chim. Acta - 1959 - 4 - 776
- 88 - REIMAN S.P. and HALL E.M. - Arch of Path - 1936 - 22 - 55
- 89 - RIEGEL B., WARTMAN W.B., HILL W.T., REEB. B.B.,
SHUBICK P. and STANGER D.W. - Cancer Research - 1951 - 11 -
301
- 90 - ROE F.C.J. - Brit. J. Cancer - 1956 - 10 - 61
- 91 - RONDONI P. - Adv. Cancer Research - 1955 - 3 - 171
- 92 - ROSICKI J. et HATSCHEK R. - Zschr Krebsforsch - 1943 - 54 -
26

- 93 - RUDALI G., BUU-HOI, LACASSAGNE A. et LECOCQ J. - Compt. Rend. Soc. Biol. - 1946 - 140 - 234
- 94 - RUSSELL I.S. and BURNETT W. - Gastroenterology - 1963 - 45 - 730
- 95 - SALAMAN M. - Brit. J. Cancer - 1952 - 6 - 155
- 96 - SALAMAN M. et GWYNN R. - Brit. J. Cancer 1951 - 5 - 252
- 97 - SALAMAN M.H. et ROE F.C.J. - Brit. J. Cancer - 1956 - 10 - 70
- 98 - SALAMAN M.H. et ROE F. - Brit. J. Cancer - 1956 - 10 - 79
- 99 - SENELAR R. - Communication personnelle -
- 100 - SOBEL A.E., HIRSHMANN A., BESMAN L. - J. Biol. Chem. - 1945 - 161 - 99
- 101 - TANNENBAUM A. - Amer. J. Cancer - 1940 - 38 - 335
- 102 - TANNENBAUM A. - Cancer Research - 1942 - 2 - 460
- 103 - TANNENBAUM A. - Cancer Res. - 1942 - 2 - 468
- 104 - TANNENBAUM A. - Acta Unio internat. Cancer - 1954 - 10 - 117
- 105 - TANNENBAUM A. et SILVERSTONE H. - Cancer Research 1949 - 9 - 724
- 106 - TANNENBAUM A. et SILVERSTONE H. - Adv. Cancer Research - 1953 - 1 - 452
- 107 - TRONCHET J. - Ann. Biol. Clin. - 1958 - 7 - 9 - 459
- 108 - TRUHAUT R., BOHUON C. et BOUDENE C. - Ann. Biol. Clin. - 1962 - 7 - 9 - 665
- 109 - TUSQUES J., SENELAR R. et ANDRE M.J. - Comp. Rendu Ass. Anat. Marseille - Avr. 1966 (sous presse)
- 110 - TUSQUES J., SENELAR R. et GANRY C. - Ann. d'Histochemie - 1961 - 6 - 23
- 111 - TUSQUES J., SENELAR R., GINGUENE Y., et VAUGIEN M. - Ann. d'Histochemie - 1964 - 9 - 269
- 112 - TUSQUES J., SENELAR R., MALVY P. et GANRY C. - Bull. Ass. Anat. 1962 - 1390
- 113 - VASSEUR E. - Acta Chimica, Scand - 1948 - 2 - 693
- 114 - VERSCHURE J.C.M. - Clin. Chim. Acta - 1956 - 1 - 18
- 115 - VERSCHURE J.C.M. et MIJNLIEFF P.F. - Clin. Chim. Acta - 1956 - 1 - 154
- 116 - VERSCHURE J.C.M., de WAEL J. et MIJNLIEFF P.F. - Clin. Chim. Acta - 1956 - 1 - 511

- 117 - VERKAMPF - Biochem et Biophys Acta - 1962 - 57 - 299
- 118 - VISWANATHAN R., AYYAR R.D., SEN S.K., MENON S.K. et SEYD ALI - J. Indian M.A. - 1962 - 38 - 399
- 119 - WATTENBERG L.W. et LEONG J.L. - J. Histochem. Cytochem - 1962 - 10 - 412
- 120 - WATTENBERG L.W., LEONG J.L. et STRAND P.J. - Cancer Research - 1962 - 22 - 1120
- 121 - WEIGERT F. - Nature 1945 - 155 - 479
- 122 - WEIGERT F. et MOTTRAM J. - Cancer Research 1946 - 6 - 109
- 123 - WHEELER G. et SKIPPER H.E. - Arch of Biochem. Biophys. - 1957 - 72 - 465
- 124 - WHITE J., MIDER G.B. et HESTON W.E. - J. Nat. Cancer Inst. - 1944 - 4 - 409
- 125 - WHITE F.R., WHITE J., MIDER G.B., KELLY M.G. et HESTON W.E. - J. Nat. Cancer. inst. - 1944 - 5 - 43
- 126 - WIELAND H. et DANE E. - Hoppe Seyler's Zsch physiol. chem. - 1933 - 219 - 240
- 127 - ZLATAKIS A., ZAK B. et BOYLE A. J. - J. Lab. Clin. Med. - 1953 - 41 - 485

TABLE DES MATIERES

	Pages
AVANT-PROPOS	15
<u>PREMIERE PARTIE :</u>	
RAPPEL DES CONNAISSANCES SUR LES FONCTIONS DE LA VESICULE BILIAIRE	17
I - Fonction d'absorption	19
II - Fonction de sécrétion	20
III - Activité métabolique	22
<u>DEUXIEME PARTIE :</u>	
MISE EN EVIDENCE D'UNE ACTION PROTECTRICE D'UN EXTRAIT AQUEUX TOTAL DE VESICULE BILIAIRE DE MOUTON CONTRE L'ACTION CANCEROGENE DU BENZO 3, 4-PYRENE	25
I - Généralités	25
II - Méthode d'expérimentation	29
- Préparation d'un extrait aqueux total de vésicule biliaire de mouton	29
- Protocole d'expérimentation sur la souris	30
III - Résultats	32

TROISIEME PARTIE :

ETUDE DE LA COMPOSITION DE L'EXTRAIT AQUEUX TOTAL DE VESICULE BILIAIRE DE MOUTON	41
I - Méthodes d'analyse	42
- Caractères généraux	42
- Eléments minéraux	42
- Composés organiques	56
II - Résultats et discussion	69

QUATRIEME PARTIE :

ETUDE DE L'ACTION PROTECTRICE DES DIFFERENTES FRACTIONS CONTRE L'ACTION CANCEROGENE DU BENZO 3,4-PYRENE	79
I - Essai d'une fraction lipidique (fraction F)	80
- Mode de préparation	80
- Protocole d'expérimentation sur la souris	81
- Résultats	81
II - Essai de la fraction protéique (fraction E)	82
- Mode de préparation	84
- Protocole d'expérimentation sur la souris	84
- Résultats	84

CINQUIEME PARTIE :

ETUDE ANALYTIQUE DE LA FRACTION PROTEIQUE BIOLOGIQUEMENT ACTIVE (FRACTION E)	89
I - Etude électrophorétique	90
II - Fractionnement sur Sephadex	97
III - Analyse des fractions E ₁ et E ₂ obtenues par fractionne- ment sur Sephadex	102
- Méthodes d'analyse	102
- Résultats et discussion	106

SIXIEME PARTIE :

ESSAI D'INTERPRETATION DES RESULTATS DE L'EXPERIMENTATION BIOLOGIQUE	113
I - Travaux antérieurs sur la protection contre la cancé- risation par les hydrocarbures polycycliques	113
- Protection par des agents chimiques	113
- Influence du régime alimentaire	121
II - Travaux personnels sur la protection contre la cancé- risation par les hydrocarbures polycycliques	122
III - Expérimentation complémentaire : Etude de la frac- tion protéique (Fraction E) sur l'évolution d'une tu- meur spontanée (carcinome mammaire de la souris C3H)	127
CONCLUSION GENERALE	131
BIBLIOGRAPHIE	135

Par délibération en date du 7 Mars 1962, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation, ni improbation.

Vu, le Président de thèse,

Vu, le Doyen de la Faculté
Mixte de Médecine et de
Pharmacie de NANTES.

Vu et permis d'imprimer.
Le Recteur de l'Académie.

" les arts graphiques "

REPROGRAPHIE

CL. EVEIN 15, RUE LA FAYETTE

44 - NANTES -

